

PATENT COOPERATION TREATY

EO/US
PCT/EP00/03588

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION (PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 02 November 2000 (02.11.00)	
International application No.: PCT/EP00/03588	Applicant's or agent's file reference: 5402P171WO HO/sl
International filing date: 20 April 2000 (20.04.00)	Priority date: 23 April 1999 (23.04.99)
Applicant: KÜPPER, Jan-Heiner et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:
02 September 2000 (02.09.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer: J. Zahra Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 5402P171WO HO/sl	FOR FURTHER ACTION	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/EP00/03588	International filing date (day/month/year) 20 April 2000 (20.04.00)	Priority date (day/month/year) 23 April 1999 (23.04.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/86, 15/87, 15/88, 7/01, 7/04, C07K 14/085, A61K 48/00		
Applicant EBERHARD-KARLS-UNIVERSITÄT TÜBINGEN UNIVERSITÄTSKLINIKUM		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>11</u> sheets, including this cover sheet. <input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of _____ sheets.
3. This report contains indications relating to the following items: I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input checked="" type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 02 September 2000 (02.09.00)	Date of completion of this report 27 July 2001 (27.07.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
pages 1-25, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
pages 1-23, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the drawings:
pages 1/2-2/2, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the sequence listing part of the description:
pages 1-4, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☒ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/03588

IV. Lack of unity of invention

1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:

- ☐ restricted the claims.
- ☐ paid additional fees.
- ☐ paid additional fees under protest.
- ☒ neither restricted nor paid additional fees.

2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is

- ☐ complied with.
- ☐ not complied with for the following reasons:

4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:

- ☐ all parts.
- ☒ the parts relating to claims Nos. 4 (completely); 1, 2, 7-10, 12-16 (in part)

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV.3

1. The International Preliminary Examining Authority is of the opinion that the present application does not meet the unity of invention requirements of PCT Art. 34(3) and PCT Rule 13.1.

The different inventions/groups of invention are:

- 1) Claim 4 (in total) and Claims 1, 2, 7-10, 12-16 (in part): **endosomolytic peptides** derived from the Cocksackie virus (CV); methods for the transfection of cells using said peptides; DNA isolates and expression vectors coding for such peptides; kits; therapeutic compositions;
- 2) Claim 11 (in total): the use of a particle or peptide derived from the Cocksackie virus for **therapy, diagnosis or prevention** of cardiovascular diseases;
- 3) Claims 1-3, 7-10, 12-16 (in part): **empty CV capsid particles**; methods for the transfection of cells using said particles; DNA isolates and expression vectors coding for said particles; kits; therapeutic compositions;
- 4) Claims 5, 6 (in total), 1-3, 7-10, 12-16 (in part): **CV particles which do not contain VP4**; methods for producing said particles by heat treatment or bonding to the receptor; methods for the transfection of cells using said particles; kits; therapeutic compositions;

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV.3

- 5) Claims 1-3, 7-10, 12-16 (in part): **CV particles in which VP4 and VP2 are still fused**; methods for the transfection of cells using said particles, DNA isolates and expression vectors coding for said particles; kits; therapeutic compositions;
- 6) Claims 17-23 (in total), Claims 1-3, 7-10, 12-16 (in part): by **genetic modification of replication-incompetent CV**; corresponding vector plasmids and auxiliary constructs; methods for producing said replication-incompetent CV; methods for the transfection of cells using said CV; kits; therapeutic compositions.

Pursuant to PCT Rule 13.1, the international application may "relate to one invention only or to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept". There should also be a technical relationship pursuant to PCT Rule 13.2 involving one or more of the same or corresponding special technical features. The inventive concept and the technical features must be novel over the prior art and non-obvious.

The aforementioned supposed inventions or group of inventions does not meet this requirement for the following reasons:

The common inventive concept of the supposed

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV.3

inventions 1) and 3)-6) is that the claimed products are non-infectious Cocksackie viruses (or parts thereof). However, this is not novel, since D1 describes UV inactivated Cocksackie viruses. D2 shows the production of non-infectious CV-A particles by heat treatment. D3 describes the recombinant production of non-infectious particles. The use of Cocksackie viruses (or parts thereof) to improve the efficiency of transfection could also be considered a special technical feature of the inventions 1) and 3)-6). However, this feature is already anticipated in D1, in which UV-inactivated CV particles were used to increase the transfection in cardiomyocytes.

There is, *a priori*, no apparent connection between the supposed invention 2) and the other supposed inventions. Claim 11 is worded so broadly that it covers all possible forms of therapy, that is not only CV-improved transfection/gene therapy.

2. The applicant did not reply within the specific time limit to the request, sent on 27 December 2000, that the claims be limited or additional fees be paid (PCT Art. 34(3)(a) and PCT Rule 68.2). Therefore, the preliminary examination was carried out for the entire invention 1), that is, Claim 4 (in total), Claims 1, 2, 7-10, 12-16 (in part) concerning endosomolytic peptides derived from the Cocksackie virus.

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV.3

3. The grouping of inventions in the preceding report of 27 December 2000 was undertaken with a view to finding a compromise between the levying of excessively high fees and the consideration of the time required to examine the individual inventions. However, it shows that there is also a lack of unity of invention (PCT Art. 34(3) and PCT Rule 13.1) within the supposed invention 1). Since an endosomolytic peptide of the Cocksackie virus is already described in D4 (see also the analysis of novelty below), the unifying concept of the peptides is not novel and each peptide must therefore be considered a separate invention. An objection with respect to a lack of unity of invention in this regard could also be raised in the later regional procedure.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 00/03588

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	8-10, 13-15	YES
	Claims	1, 2, 4, 7, 12, 16	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1, 2, 4, 7-10, 12-16	NO
Industrial applicability (IA)	Claims		YES
	Claims	1, 2, 4, 7-10, 12-16	NO

2. Citations and explanations

The report makes reference to the following documents:

- D1: KERN C. ET AL.: 'Coxsackievirus-verstärkter endosomolytischer Gentransfer in kontraktile Kardiomyozyten'. VERH. DTSCH. GES. PATH., Vol 81, 1997, page 611, mentioned in the application
- D2: MCGEADY M.L. AND CROWELL R.L.: 'Proteolytic cleavage of VP1 in 'A' particles of Coxsackievirus B3 does not appear to mediate virus uncoating by HeLa cells.' J. GEN. VIROL., Vol. 55, 1981, pages 439-450
- D3: YANG Y.-Z. ET AL.: 'Study on the etiological diagnosis and immunization of viral myocarditis: producing non-infectious CVB3 particles by recombinant vaccinia virus.' JOURNAL OF MOLECULAR AND CELLULAR CARDIOLOGY, Vol. 30, June 1998 (1998-06), page A185
- D4: PLANK C. ET AL.: 'Application of membrane-active peptides for drug and gene delivery across cellular membranes' ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, Vol. 34, 1998, pages 21-35

D5: LINDBERG A.M. ET AL.: 'Genome of Coxsackievirus B3'
VIROLOGY, Vol. 156, 1987, pages 50-63, mentioned in
the application

D6: ZAUNER W. ET AL.: 'Rhinovirus-mediated endosomal
release of transfection complexes.' JOURNAL OF
VIROLOGY, Vol. 69, No. 2, 1995, pages 1085-1092.

1. The present application does not meet the
requirements of PCT Article 33(2) because the
subject matter of Claims 1, 2, 4, 7, 12 and 16 is
not novel.

1.1 D4 claims the use of membrane-active peptides for
the delivery of drugs or oligonucleotides and
plasmid DNA. For example, the abstract states:
"Incorporation of synthetic membrane-active peptides
into delivery systems has been found to enhance the
intracellular delivery of drugs including
oligonucleotides, peptides or plasmid DNA." A
sequence of the VP1 of the Coxsackie virus is listed
in Table 2 as one of the possible membrane-active
peptides.

D4 is therefore prejudicial to the novelty of Claims
1, 2, 7, 12 and 16.

1.2 D5 discloses the entire sequence of the Coxsackie
virus B3.

The wording "preferably less than 30 amino acids"
renders Claim 4 very broad and also encompasses
polypeptides which are longer than 30 amino acids.
In addition, under point c), the claim contains the
wording "the amino acid sequence includes one of the
peptides from a) or b)". According to the PCT

Examination Guidelines, Chapter III-4.13, "includes" means the same as "contains". Because the entire sequence of Cossackie virus B3 contains all of the peptides listed in the claim, D5 is prejudicial to novelty.

2. The present application does not meet the requirements of PCT Article 33(3) because the subject matter of Claims 1, 2, 4, 7-10 and 12-16 does not involve an inventive step.
- 2.1 The problem addressed by the present application is the preparation of peptides with endosomolytic effect which reinforce the transfection of DNA. The proposed solution involves the provision of peptides from CVB3. The description of the present application does not give any indication, however, as to whether the proposed peptides actually solve the problem of interest. It is not shown whether the specific peptides of the SEQ ID Nos. 1-10 do in fact have an endosomolytic effect and thereby reinforce transfection efficiency. Attention is merely drawn to the fact that "initial results from the inventors' laboratory show that the peptides as per Example 4 can effect a transfection whose efficiency is greater than the efficiency of lipofection mediated by the Adeno virus" (page 25, second section).

This statement is not sufficient to show plausibly that said peptides do actually reinforce lipofection. The necessary control experiments are lacking, that is, a comparison of the efficiency of lipofection with or without the peptides. The comparison with lipofection mediated by the Adeno virus is insufficient, since that is a matter of

independent values known from the prior art. In addition, the "initial results" (which are not shown) consist clearly of highly provisional data that are not confirmed through repetition.

It follows from the above that the applicant has not shown plausibly that the application actually solves the problem of interest. In these circumstances, it is not possible to acknowledge inventive step (PCT Article 33(3)).

- 2.2 Even leaving aside the arguments in point 2.1, that is, if one were to assume that the problem of interest addressed by the application were solved by the proposed peptides, it would still not be possible to identify an inventive step, for the following reasons:

D4 already describes a membrane-active peptide for use in DNA transfection (Tables 1 and 2). In addition, D6 also shows that a peptide from the VP1 protein of HRV2, a near relative of Coxsackie viruses, increases transfection efficiency (Fig. 7). Proceeding from D4, which documents the closest prior art, the problem addressed by the present application is therefore the provision of further endosomolytic peptides from the Coxsackie virus. The solution to this problem, however, requires nothing more than a random selection of peptides from a large number of possible peptides which can be derived from the sequence of proteins in D5.

In order for inventive step to be acknowledged, it must be shown that the peptides satisfy the criteria of a select invention. It therefore needs to be shown that the peptides as per the invention have a surprising, unexpected technical effect which characterises them with respect to the plurality of

other possible peptides. Alternatively, it must be shown that only a few peptides in the entire sequence have an endosomolytic effect at all. However, nowhere in the description does it state how the specific peptide sequences were selected. There are therefore no suggestions that the peptides as per the invention were found by means of an inventive selection in the sense described. An inventive step (PCT Article 33(3)) cannot therefore be acknowledged.

3. It follows of necessity from the analysis of inventive step in point 2.1 that the subject matter of Claims 1, 2, 4, 7-10 and 12-16 is not industrially applicable (PCT Article 33(4) and PCT Rule 5.1). PCT Rule 5.1(vi) demands that "the way in which the invention is capable of exploitation in industry and the way in which it can be made and used" be indicated. Since it was not shown that the peptides as per the invention increase transfection efficiency, it is not clear for what purpose said peptides could be used. The statement in the description is restricted merely to the speculative assumption of a specific function. The description does not therefore contain any information which a person skilled in the art could not have derived himself from the sequence. This information is not sufficient on its own to ensure that the peptides have a direct use. The production alone of peptides without a use is not considered industrially applicable, since obviously it makes no sense to manufacture peptides for no specific purpose.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

Intern application No.
PCT/EP 00/03588

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. Claims 1 and 2 do not meet the requirements of PCT Article 6 because the subject matter for which protection is sought is not clearly defined. The claims attempt to define the subject matter by the result which is to be achieved, and in doing so merely state the problem addressed.
2. In Claim 4, and the claims which refer thereto, it is not clear how far the scope of protection extends. The peptides wherein "one or more of the amino acids are missing or are substituted for others with respect to the peptides from a)" are not defined precisely enough. The scope of protection becomes unlimited as a result and not clearly distinguishable from the prior art.
3. Claim 12 relates to the use of a peptide in gene therapy. The PCT does not contain uniform criteria for assessing the industrial applicability of said claim. Patentability may also depend on the wording of the claims. The EPO, for example, does not recognise the industrial applicability of claims to the use of a compound in a medical treatment; it does, however, allow claims to the first medical use of a known compound or to the use of such a compound in the manufacture of a drug for a new medical application.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

PCT

An
WITTE, WELLER & PARTNER
z.H. OTTEN, Hajo
Postfach 105462
D-70047 Stuttgart
GERMANY

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERMITTLUNG DES
INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHTS
ODER DER ERKLÄRUNG

(Regel 44.1 PCT)

WITTE, WELLER & PARTNER
Patentanwälte

24. Aug. 2000

Absenddatum
(Tag/Monat/Jahr)

24/08/2000

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts

5402P171WO H0/s1

WEITERES VORGEHEN

siehe Punkte 1 und 4 unten

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/03588 ✓

Internationales Anmeldedatum

(Tag/Monat/Jahr)

20/04/2000 ✓

Anmelder

EBERHARD-KARLS-UNIVERSITÄT TÜBINGEN UNIVERSITATSKL

1. ☒ Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß der internationale Recherchenbericht erstellt wurde und ihm hiermit übermittelt wird.

Einreichung von Änderungen und einer Erklärung nach Artikel 19:

Der Anmelder kann auf eigenen Wunsch die Ansprüche der internationalen Anmeldung ändern (siehe Regel 46):

Bis wann sind Änderungen einzureichen?

Die Frist zur Einreichung solcher Änderungen beträgt üblicherweise zwei Monate ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts; weitere Einzelheiten sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.

Wo sind Änderungen einzureichen?

Unmittelbar beim Internationalen Büro der WIPO, 34, CHEMIN des Colombettes, CH-1211 Genf 20,
Telefaxnr.: (41-22) 740.14.35

Nähere Hinweise sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.

2. ☐ Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß kein internationaler Recherchenbericht erstellt wird und daß ihm hiermit die Erklärung nach Artikel 17(2)a) übermittelt wird.

3. ☐ **Hinsichtlich des Widerspruchs** gegen die Entrichtung einer zusätzlichen Gebühr (zusätzlicher Gebühren) nach Regel 40.2 wird dem Anmelder mitgeteilt, daß

☐ der Widerspruch und die Entscheidung hierüber zusammen mit seinem Antrag auf Übermittlung des Wortlauts sowohl des Widerspruchs als auch der Entscheidung hierüber an die Bestimmungssämter dem Internationalen Büro übermittelt worden sind.

☐ noch keine Entscheidung über den Widerspruch vorliegt; der Anmelder wird benachrichtigt, sobald eine Entscheidung getroffen wurde.

4. **Weiteres Vorgehen:** Der Anmelder wird auf folgendes aufmerksam gemacht:

Kurz nach Ablauf von **18 Monaten** seit dem Prioritätsdatum wird die internationale Anmeldung vom Internationalen Büro veröffentlicht. Will der Anmelder die Veröffentlichung verhindern oder auf einen späteren Zeitpunkt verschieben, so muß gemäß Regel 90 bis bzw. 90^{bis} 3 vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung eine Erklärung über die Zurücknahme der internationalen Anmeldung oder des Prioritätsanspruchs beim Internationalen Büro eingehen.

Innerhalb von **19 Monaten** seit dem Prioritätsdatum ist ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung einzureichen, wenn der Anmelder den Eintritt in die nationale Phase bis zu 30 Monaten seit dem Prioritätsdatum (in manchen Ämtern sogar noch länger) verschieben möchte.

Innerhalb von **20 Monaten** seit dem Prioritätsdatum muß der Anmelder die für den Eintritt in die nationale Phase vorgeschriebenen Handlungen vor allen Bestimmungssämtern vornehmen, die nicht innerhalb von 19 Monaten seit dem Prioritätsdatum in der Anmeldung oder einer nachträglichen Auswählerklärung ausgewählt wurden oder nicht ausgewählt werden konnten, da für sie Kapitel II des Vertrages nicht verbindlich ist.

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde



Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Andria Overbeeke-Siepkens

ANMERKUNGEN ZU FORMBLATT PCT/ISA/220

Diese Anmerkungen sollen grundlegende Hinweise zur Einreichung von Änderungen gemäß Artikel 19 geben. Diesen Anmerkungen liegen die Erfordernisse des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens (PCT), der Ausführungsordnung und der Verwaltungsrichtlinien zu diesem Vertrag zugrunde. Bei Abweichungen zwischen diesen Anmerkungen und obengenannten Texten sind letztere maßgebend. Nähere Einzelheiten sind dem PCT-Leitfaden für Anmelder, einer Veröffentlichung der WIPO, zu entnehmen.

Die in diesen Anmerkungen verwendeten Begriffe "Artikel", "Regel" und "Abschnitt" beziehen sich jeweils auf die Bestimmungen des PCT-Vertrags, der PCT-Ausführungsordnung bzw. der PCT-Verwaltungsrichtlinien.

HINWEISE ZU ÄNDERUNGEN GEMÄSS ARTIKEL 19

Nach Erhalt des internationalen Recherchenberichts hat der Anmelder die Möglichkeit, einmal die Ansprüche der internationalen Anmeldung zu ändern. Es ist jedoch zu betonen, daß, da alle Teile der internationalen Anmeldung (Ansprüche, Beschreibung und Zeichnungen) während des internationalen vorläufigen Prüfungsverfahrens geändert werden können, normalerweise keine Notwendigkeit besteht, Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 einzureichen, außer wenn der Anmelder z.B. zum Zwecke eines vorläufigen Schutzes die Veröffentlichung dieser Ansprüche wünscht oder ein anderer Grund für eine Änderung der Ansprüche vor ihrer internationalen Veröffentlichung vorliegt. Weiterhin ist zu beachten, daß ein vorläufiger Schutz nur in einigen Staaten erhältlich ist.

Welche Teile der internationalen Anmeldung können geändert werden?

Im Rahmen von Artikel 19 können nur die Ansprüche geändert werden.

In der internationalen Phase können die Ansprüche auch nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert (oder nochmals geändert) werden. Die Beschreibung und die Zeichnungen können nur nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert werden.

Beim Eintritt in die nationale Phase können alle Teile der internationalen Anmeldung nach Artikel 28 oder gegebenenfalls Artikel 41 geändert werden.

Bis wann sind Änderungen einzureichen?

Innerhalb von zwei Monaten ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts oder innerhalb von sechzehn Monaten ab dem Prioritätsdatum, je nachdem, welche Frist später abläuft. Die Änderungen gelten jedoch als rechtzeitig eingereicht, wenn sie dem Internationalen Büro nach Ablauf der maßgebenden Frist, aber noch vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung (Regel 46.1) zugehen.

Wo sind die Änderungen nicht einzureichen?

Die Änderungen können nur beim Internationalen Büro, nicht aber beim Anmeldeamt oder der Internationalen Recherchenbehörde eingereicht werden (Regel 46.2).

Falls ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung eingereicht wurde/wird, siehe unten.

In welcher Form können Änderungen erfolgen?

Eine Änderung kann erfolgen durch Streichung eines oder mehrerer ganzer Ansprüche, durch Hinzufügung eines oder mehrerer neuer Ansprüche oder durch Änderung des Wortlauts eines oder mehrerer Ansprüche in der eingereichten Fassung.

Für jedes Anspruchsblatt, das sich aufgrund einer oder mehrerer Änderungen von dem ursprünglich eingereichten Blatt unterscheidet, ist ein Ersatzblatt einzureichen.

Alle Ansprüche, die auf einem Ersatzblatt erscheinen, sind mit arabischen Ziffern zu numerieren. Wird ein Anspruch gestrichen, so brauchen die anderen Ansprüche nicht neu numeriert zu werden. Im Fall einer Neunummerierung sind die Ansprüche fortlaufend zu nummerieren (Verwaltungsrichtlinien, Abschnitt 205 b)).

Die Änderungen sind in der Sprache abzufassen, in der die internationale Anmeldung veröffentlicht wird.

Welche Unterlagen sind den Änderungen beizufügen?

Begleitschreiben (Abschnitt 205 b)):

Die Änderungen sind mit einem Begleitschreiben einzureichen.

Das Begleitschreiben wird nicht zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht. Es ist nicht zu verwechseln mit der "Erklärung nach Artikel 19(1)" (siehe unten, "Erklärung nach Artikel 19 (1)").

Das Begleitschreiben ist nach Wahl des Anmelders in englischer oder französischer Sprache abzufassen. Bei englischsprachigen internationalen Anmeldungen ist das Begleitschreiben aber ebenfalls in englischer, bei französischsprachigen internationalen Anmeldungen in französischer Sprache abzufassen.

ANMERKUNGEN ZU FORMBLATT PCT/ISA/220 (Fortsetzung)

Im Begleitschreiben sind die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen anzugeben. So ist insbesondere zu jedem Anspruch in der internationalen Anmeldung anzugeben (gleichlautende Angaben zu verschiedenen Ansprüchen können zusammengefaßt werden), ob

- i) der Anspruch unverändert ist;
- ii) der Anspruch gestrichen worden ist;
- iii) der Anspruch neu ist;
- iv) der Anspruch einen oder mehrere Ansprüche in der eingereichten Fassung ersetzt;
- v) der Anspruch auf die Teilung eines Anspruchs in der eingereichten Fassung zurückzuführen ist.

Im folgenden sind Beispiele angegeben, wie Änderungen im Begleitschreiben zu erläutern sind:

1. [Wenn anstelle von ursprünglich 48 Ansprüchen nach der Änderung einiger Ansprüche 51 Ansprüche existieren]:
"Die Ansprüche 1 bis 29, 31, 32, 34, 35, 37 bis 48 werden durch geänderte Ansprüche gleicher Numerierung ersetzt; Ansprüche 30, 33 und 36 unverändert; neue Ansprüche 49 bis 51 hinzugefügt."
2. [Wenn anstelle von ursprünglich 15 Ansprüchen nach der Änderung aller Ansprüche 11 Ansprüche existieren]:
"Geänderte Ansprüche 1 bis 11 treten an die Stelle der Ansprüche 1 bis 15."
3. [Wenn ursprünglich 14 Ansprüche existierten und die Änderungen darin bestehen, daß einige Ansprüche gestrichen werden und neue Ansprüche hinzugefügt werden]:
Ansprüche 1 bis 6 und 14 unverändert; Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt. "Oder" Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt; alle übrigen Ansprüche unverändert."
4. [Wenn verschiedene Arten von Änderungen durchgeführt werden]:
"Ansprüche 1-10 unverändert; Ansprüche 11 bis 13, 18 und 19 gestrichen; Ansprüche 14, 15 und 16 durch geänderten Anspruch 14 ersetzt; Anspruch 17 in geänderte Ansprüche 15, 16 und 17 unterteilt; neue Ansprüche 20 und 21 hinzugefügt."

"Erklärung nach Artikel 19(1)" (Regel 46.4)

Den Änderungen kann eine Erklärung beigelegt werden, mit der die Änderungen erläutert und ihre Auswirkungen auf die Beschreibung und die Zeichnungen dargelegt werden (die nicht nach Artikel 19 (1) geändert werden können).

Die Erklärung wird zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht.

Sie ist in der Sprache abzufassen, in der die internationale Anmeldung veröffentlicht wird.

Sie muß kurz gehalten sein und darf, wenn in englischer Sprache abgefaßt oder ins Englische übersetzt, nicht mehr als 500 Wörter umfassen.

Die Erklärung ist nicht zu verwechseln mit dem Begleitschreiben, das auf die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen hinweist, und ersetzt letzteres nicht. Sie ist auf einem gesonderten Blatt einzureichen und in der Überschrift als solche zu kennzeichnen, vorzugsweise mit den Worten "Erklärung nach Artikel 19 (1)".

Die Erklärung darf keine herabsetzenden Äußerungen über den internationalen Recherchenbericht oder die Bedeutung von in dem Bericht angeführten Veröffentlichungen enthalten. Sie darf auf im internationalen Recherchenbericht angeführte Veröffentlichungen, die sich auf einen bestimmten Anspruch beziehen, nur im Zusammenhang mit einer Änderung dieses Anspruchs Bezug nehmen.

Auswirkungen eines bereits gestellten Antrags auf internationale vorläufige Prüfung

Ist zum Zeitpunkt der Einreichung von Änderungen nach Artikel 19 bereits ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung gestellt worden, so sollte der Anmelder in seinem Interesse gleichzeitig mit der Einreichung der Änderungen beim Internationalen Büro auch eine Kopie der Änderungen bei der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde einreichen (siehe Regel 62.2 a), erster Satz).

Auswirkungen von Änderungen hinsichtlich der Übersetzung der internationalen Anmeldung beim Eintritt in die nationale Phase

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß bei Eintritt in die nationale Phase möglicherweise anstatt oder zusätzlich zu der Übersetzung der Ansprüche in der eingereichten Fassung eine Übersetzung der nach Artikel 19 geänderten Ansprüche an die bestimmten/ausgewählten Ämter zu übermitteln ist.

Nähere Einzelheiten über die Erfordernisse jedes bestimmten/ausgewählten Amtes sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 5402P171WO HO/s1 ✓	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 00/03588 ✓	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 20/04/2000 ✓	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 23/04/1999 ✓
Anmelder EBERHARD-KARLS-UNIVERSITÄT TÜBINGEN UNIVERSITÄTSSKL		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 5 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbaren **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☒ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PC 00/03588

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/86 C12N15/87 C12N15/88 C12N7/01 C12N7/04
C07K14/085 A61K48/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	✓ KERN C. ET AL.: "Coxsackievirus-verstärkter endosomolytischer Gentransfer in kontraktile Kardiomyozyten." VERH. DTSCH. GES. PATH., Bd. 81, 1997, Seite 611 XP000929840 in der Anmeldung erwähnt	1-3, 7-12, 15
Y	Zusammenfassung	5, 6
Y ✓	MCGEADY M. L. AND CROWELL R. L.: "Proteolytic cleavage of VP1 in 'A' particles of Coxsackievirus B3 does not appear to mediate virus uncoating by HeLa cells." J. GEN. VIROL., Bd. 55, 1981, Seiten 439-450, XP000929909 das ganze Dokument	5, 6

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

10. August 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

24/08/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Mandl, B

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A ✓	<p>RAAB DE VERDUGO U. ET AL.: "Characterization of a 100-kilodalton binding protein for the six serotype of Cocksackie B viruses." JOURNAL OF VIROLOGY, Bd. 69, Nr. 11, November 1995 (1995-11), Seiten 6751-6757, XP002074335 Seite 6753, linke Spalte, letzter Absatz -rechte Spalte, Absatz 1 Seite 6755, linke Spalte, letzter Absatz -rechte Spalte, Absatz 1</p>	6
X ✓	<p>--- YANG Y.-Z. ET AL.: "Study on the etiological diagnosis and immunization of viral myocarditis: producing non-infectious CVB3 particles by recombinant vaccinia virus." JOURNAL OF MOLECULAR AND CELLULAR CARDIOLOGY, Bd. 30, Juni 1998 (1998-06), Seite A185 XP000929896 das ganze Dokument</p>	1-3,11, 13,14, 16-18,22
X ✓	<p>--- PLANK C. ET AL.: "Application of membrane-active peptides for drug and gene delivery across cellular membranes." ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, Bd. 34, 1998, Seiten 21-35, XP000929877 das ganze Dokument</p>	1,2, 7-12,15, 16
X ✓	<p>--- LINDBERG A. M. ET AL.: "Genome of Cocksackievirus B3" VIROLOGY, Bd. 156, 1987, Seiten 50-63, XP000929890 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p>	3
A ✓	<p>--- ZAUNER W. ET AL.: "Rhinovirus-mediated endosomal release of transfection complexes." JOURNAL OF VIROLOGY, Bd. 69, Nr. 2, 1995, Seiten 1085-1092, XP002144697 ISSN: 0022-538X das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	1-23

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A ✓	<p>COTTEN M. ET AL.: "HIGH-EFFICIENCY RECEPTOR-MEDIATED DELIVERY OF SMALL AND LARGE 48 KILOBASE GENE CONSTRUCTS USING THE ENDOSOME-DISRUPTION ACTIVITY OF DEFECTIVE OR CHEMICALLY INACTIVATED ADENOVIRUS PARTICLES"</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, Bd. 89, Nr. 13, 1992, Seiten 6094-6098, XP002144698 1992 ISSN: 0027-8424 das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-23
A ✓	<p>WAGNER E. ET AL.: "INFLUENZA VIRUS HEMAGGLUTININ HA-2 N-TERMINAL FUSOGENIC PEPTIDES AUGMENT GENE TRANSFER BY TRANSFERRIN-POLYLYSINE-DNA COMPLEXES: TOWARD A SYNTHETIC VIRUS-LIKE GENE-TRANSFER VEHICLE"</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA,US,NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, Bd. 89, Nr. 17, 1. September 1992 (1992-09-01), Seiten 7934-7938, XP000371760 ISSN: 0027-8424 das ganze Dokument, insbesondere Seite 7934, linke Spalte, vorletzte Absatz</p> <p>---</p>	1-23
A ✓	<p>US 5 547 932 A (CURIEL DAVID T ET AL) 20. August 1996 (1996-08-20) Spalte 13, letzter Absatz Spalte 14, Absatz 4 - letzter Absatz Spalte 17, Absatz 5 - Absatz 6 Beispiel 29</p> <p>---</p>	1-23
A ✓	<p>WO 98 39426 A (KOLBECK PETER ;UNIV NEBRASKA (US); CHAPMAN NORA M (US); MALONE JAM) 11. September 1998 (1998-09-11) das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	17-23

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Obwohl die Ansprüche 7,8 und 11, soweit sie eine in vivo Anwendung betreffen, sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zu einer Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PC 00/03588

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5547932 A	20-08-1996	US 6022735 A	08-02-2000
		US 6077663 A	20-06-2000
		US 5981273 A	09-11-1999
		AU 671084 B	15-08-1996
		AU 2652692 A	03-05-1993
		BG 98718 A	28-02-1995
		BR 9206559 A	08-11-1994
		CA 2118816 A	31-03-1993
		CZ 9400746 A	17-05-1995
		WO 9307283 A	15-04-1993
		EP 0545016 A	09-06-1993
		EP 0607206 A	27-07-1994
		FI 941474 A	30-03-1994
		HU 71312 A	28-11-1995
		HU 9500694 A	29-01-1996
		JP 10506001 T	16-06-1998
		MX 9205543 A	01-05-1993
		NO 941154 A	29-03-1994
		NZ 244306 A	26-07-1995
		SG 44680 A	19-12-1997
		SI 9200236 A	31-03-1993
		SK 36894 A	10-08-1994
		CN 1070946 A	14-04-1993
		RU 2138553 C	27-09-1999
		ZA 9207460 A	21-02-1994
WO 9839426 A	11-09-1998	US 6071742 A	06-06-2000
		AU 6346098 A	22-09-1998
		EP 0973879 A	26-01-2000

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

An:

OTTEN, Hajo
WITTE, WELLER & PARTNER
Postfach 105462 WITTE, WELLER & PARTNER
D-70047 Stuttgart Patentanwälte
ALLEMAGNE

30. Juli 2001

Frist:

notiert:

PCT

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG
DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNGSBERICHTS
(Regel 71.1 PCT)

Absendedatum

(Tag/Monat/Jahr)

27.07.2001

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts

5402P171WO HO/pd ✓

WICHTIGE MITTEILUNG

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP00/03588 ✓

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)

20/04/2000 ✓

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)

23/04/1999 ✓

Anmelder

EBERHARD-KARLS-UNIVERSITÄT TÜBINGEN UNIVERSITATSKL ✓

1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.
2. Eine Kopie des Berichts wird - gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen - dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.
3. Auf Wunsch eines ausgewählten Amtes wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.

4. ERINNERUNG

Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde



Europäisches Patentamt
D-80298 München
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Bevollmächtigter Bediensteter

Neumann, M

Tel. +49 89 2399-7351




VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 5402P171WO HO/pd	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/03588	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 20/04/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 23/04/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/86		
Anmelder EBERHARD-KARLS-UNIVERSITÄT TÜBINGEN UNIVERSITATSKL		
<p>1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.</p> <p>2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 11 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.</p> <p><input type="checkbox"/> Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).</p> <p>Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.</p>		
<p>3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Grundlage des Berichts</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priorität</p> <p>III <input type="checkbox"/> Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit</p> <p>IV <input checked="" type="checkbox"/> Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Bestimmte angeführte Unterlagen</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung</p>		
Datum der Einreichung des Antrags 02/09/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 27.07.2001	
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Lanzrein, M Tel. Nr. +49 89 2399 7358	



I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-25 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-23 ursprüngliche Fassung

Zeichnungen, Blätter:

1/2-2/2 ursprüngliche Fassung

Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:

1-4, in der ursprünglich eingereichten Fassung.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen

Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

IV. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung

1. Auf die Aufforderung zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren hat der Anmelder:

- ☐ die Ansprüche eingeschränkt.
- ☐ zusätzliche Gebühren entrichtet.
- ☐ zusätzliche Gebühren unter Widerspruch entrichtet.
- ☒ weder die Ansprüche eingeschränkt noch zusätzliche Gebühren entrichtet.

2. ☐ Die Behörde hat festgestellt, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nicht erfüllt ist, und hat gemäß Regel 68.1 beschlossen, den Anmelder nicht zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren aufzufordern.

3. Die Behörde ist der Auffassung, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nach den Regeln 13.1, 13.2 und 13.3

- ☐ erfüllt ist
- ☐ aus folgenden Gründen nicht erfüllt ist:

4. Daher wurde zur Erstellung dieses Berichts eine internationale vorläufige Prüfung für folgende Teile der internationalen Anmeldung durchgeführt:

- ☐ alle Teile.
- ☒ die Teile, die sich auf die Ansprüche Nr. 4 (completely); 1, 2, 7-10, 12-16 (partially) beziehen.

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	8-10, 13-15
	Nein: Ansprüche	1, 2, 4, 7, 12, 16
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1, 2, 4, 7-10, 12-16
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1, 2, 4, 7-10, 12-16

**2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt**

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

- D1: KERN C. ET AL.: 'Coxsackievirus-verstärkter endosomolytischer Gentransfer in kontraktile Kardiomyozyten.' VERH. DTSCH. GES. PATH. , Bd. 81, 1997, Seite 611, in der Anmeldung erwähnt.
- D2: MCGEADY M. L. AND CROWELL R. L.: 'Proteolytic cleavage of VP1 in 'A' particles of Coxsackievirus B3 does not appear to mediate virus uncoating by HeLa cells.' J. GEN. VIROL., Bd. 55, 1981, Seiten 439-450.
- D3: YANG Y.-Z. ET AL.: 'Study on the etiological diagnosis and immunization of viral myocarditis: producing non-infectious CVB3 particles by recombinant vaccinia virus.' JOURNAL OF MOLECULAR AND CELLULAR CARDIOLOGY, Bd. 30, Juni 1998 (1998-06), Seite A185.
- D4: PLANK C. ET AL.: 'Application of membrane-active peptides for drug and gene delivery across cellular membranes.' ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, Bd. 34, 1998, Seiten 21-35.
- D5: LINDBERG A. M. ET AL.: 'Genome of Coxsackievirus B3' VIROLOGY, Bd. 156, 1987, Seiten 50-63, in der Anmeldung erwähnt
- D6: ZAUNER W. ET AL.: 'Rhinovirus-mediated endosomal release of transfection complexes.' JOURNAL OF VIROLOGY, Bd. 69, Nr. 2, 1995, Seiten 1085-1092.

Zu Punkt IV

Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung

1. Die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde ist der Ansicht, dass die vorliegende Anmeldung die Erfordernisse bezüglich der Einheitlichkeit der Erfindung im Sinne von Art. 34(3) PCT und Regel 13.1 PCT nicht erfüllt.

Die verschiedenen Erfindungen/Gruppen von Erfindungen sind:

- 1) Ansprüche 4 (komplett), 1, 2, 7-10, 12-16 (teilweise): Vom Cocksackievirus (CV) abgeleitete **endosomolytische Peptide**; Verfahren zur Transfektion von Zellen unter Verwendung besagter Peptide; DNA Isolate und Expressionvektoren codierend für besagte Peptide; Kits; therapeutische Zusammensetzungen.
- 2) Anspruch 11 (komplett): Verwendung eines von Cocksackievirus abgeleiteten Partikels oder Peptids zur **Therapie, Diagnostik oder Prophylaxe** von Herz-Kreislauf-Erkrankungen.
- 3) Ansprüche 1-3, 7-10, 12-16 (teilweise): **leere CV Kapsidpartikel**; Verfahren zur Transfektion von Zellen unter Verwendung besagter Partikel; DNA Isolate und Expressionvektoren codierend für besagte Partikel; Kits; therapeutische Zusammensetzungen
- 4) Ansprüche 5, 6 (komplett), 1-3, 7-10, 12-16 (teilweise): **CV Partikel, denen VP4 fehlt**; Verfahren zur Herstellung besagter Partikel durch Hitzebehandlung oder Bindung an den Rezeptor; Verfahren zur Transfektion von Zellen unter Verwendung besagter Partikel; Kits; therapeutische Zusammensetzungen.
- 5) Ansprüche 1-3, 7-10, 12-16 (teilweise): **CV Partikel, bei denen VP4 und VP2 noch fusioniert sind**; Verfahren zur Transfektion von Zellen unter Verwendung besagter Partikel DNA Isolate und Expressionvektoren codierend für besagte Partikel; Kits; therapeutische Zusammensetzungen.
- 6) Ansprüche 17-23 (komplett), 1-3, 7-10, 12-16 (teilweise): durch **genetische Modifikation replikationsinkompetente CV**; zugehörige Vektor Plasmide und Helfer-Konstrukte; Verfahren zur Erzeugung besagter replikationsinkompetenter CV; Verfahren zur Transfektion von Zellen unter Verwendung besagter CV; Kits; therapeutische Zusammensetzungen.

Infolge der Regel 13.1 PCT darf sich die Internationale Anmeldung "nur auf eine Erfindung oder eine Gruppe von Erfindungen beziehen, die so zusammenhängen,

dass sie eine einzige allgemeine erfinderische Idee verwirklichen". Dabei sollte ein technischer Zusammenhang im Sinne der Regel 13.2 PCT bestehen, der in einem oder mehreren gleichen oder entsprechenden besonderen technischen Merkmal/en zum Ausdruck kommt. Die Erfinderische Idee bzw. die besonderen technischen Merkmale müssen gegenüber dem Stand der Technik neu und nicht nahegelegt sein.

Aus den folgenden Gründen ist diese Erfordernis bei den obengenannten angeblichen Erfindungen/Gruppen nicht erfüllt:

Das gemeinsame erfinderische Konzept ("erfinderische Idee") der angeblichen Erfindungen 1), 3)-6) liegt darin, dass es sich bei den beanspruchten Produkten um nichtinfektiöse Cocksackieviren (oder Teile davon) handelt. Dies ist jedoch nicht neu, denn D1 beschreibt UV inaktivierte Cocksackieviren. D2 zeigt die Herstellung von nichtinfektiösen CV-A Partikel durch Hitzebehandlung. D3 beschreibt die rekombinante Herstellung nichtinfektiöser Partikel.

Als besonderes technisches Merkmal der Erfindungen 1), 3)-6) könnte auch die Verwendung der Cocksackieviren (oder Teilen davon) zur Verbesserung der Transfektionseffizienz gesehen werden. Dieses Merkmal ist jedoch auch schon vorweggenommen in D1, wo UV-inaktivierte CV Partikel zur Steigerung der Transfektion in Kardiomyozyten eingesetzt wurden.

Bei der angeblichen Erfindung 2) kann *a priori* kein Zusammenhang gesehen werden zu den anderen angeblichen Erfindungen. Der Anspruch 11 ist so breit formuliert, dass darunter alle möglichen Therapieformen fallen, also nicht nur durch CV verbesserte Transfektion/Gentherapie.

2. Auf die Aufforderung zur Beschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren (Art. 34 (3) a) und Regel 68.2 PCT), abgeschickt am 27. 12. 2000, hat der Anmelder nicht innerhalb der vorgegebenen Zeitlimite geantwortet.

Deshalb wurde die vorläufige Prüfung für die genannte Erfindung 1), d.h. Ansprüche 4 (komplett), 1, 2, 7-10, 12-16 (teilweise) betreffend vom Cocksackievirus abgeleitete endosomolytische Peptide durchgeführt.

3. Die Gruppierung der Erfindungen im vorhergehenden Bescheid vom 27. 12. 2000 wurde im Sinne eines Kompromisses zwischen der Erhebung von übermässig hohen Gebühren und der Berücksichtigung des Aufwandes der Prüfung für die einzelnen Erfindungen vorgenommen.
- Es zeigt sich jedoch, dass innerhalb der angeblichen Erfindung 1) auch Uneinheitlichkeit im Sinne von Art 34(3) und Regel 13.1 PCT besteht.
- Da nämlich schon ein endosomolytisches Peptid des Cocksackievirus in D4 beschrieben wurde (siehe auch Neuheitsanalyse weiter unten), ist das vereinheitlichende Konzept der Peptide nicht neu und jedes Peptid muss deshalb als separate Erfindung betrachtet werden.
- In späteren regionalen Verfahren könnte auch ein Einheitlichkeitseinwand in diesem Sinne erhoben werden.

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Die vorliegende Anmeldung erfüllt nicht die Erfordernisse des Artikels 33(2) PCT, weil der Gegenstand der Ansprüche 1, 2, 4, 7, 12, 16 nicht neu ist.
- 1.1 D4 bespricht die Verwendung von membranaktiven Peptiden zur Einschleusung von Pharmaka oder Oligonukleotiden sowie Plasmid DNA. Dazu wird z.B. im Abstract gesagt: "Incorporation of synthetic membrane-active peptides into delivery systems has been found to enhance the intracellular delivery of drugs including oligonucleotides, peptides, or plasmid DNA.". Als eines der möglichen membranaktiven Peptide wird in Tabelle 2 eine Sequenz aus dem VP1 des Cocksackie Virus aufgeführt.
- D4 ist deshalb neuheitsschädlich für die Ansprüche 1, 2, 7, 12, 16.
- 1.2 D5 offenbart die gesamte Sequenz des Cocksackievirus B3.
- Anspruch 4 wird durch die Formulierung "vorzugsweise weniger als 30

Aminosäuren" sehr breit und umfasst auch Polypeptide, die länger als 30 Aminosäuren sind. Ausserdem enthält der Anspruch unter c) die Formulierung "die Aminosäuresequenz eines der Peptide aus a) oder b) umfassen." Im Sinne der Richtlinien für die Prüfung Teil CIII 4.13 ist "umfassen" gleichzusetzen mit "beinhalten". Dadurch, dass die Gesamtsequenz von Cocksackievirus B3 alle im Anspruch aufgeführten Peptide beinhaltet, ist D5 neuheitschädlich.

2. Die vorliegende Anmeldung erfüllt nicht die Erfordernisse des Artikels 33 (3) PCT, weil der Gegenstand des der Ansprüche 1, 2, 4, 7-10, 12-16 nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit beruht.

- 2.1 Die Aufgabe der vorliegenden Anmeldung bestand in der Bereitstellung von Peptiden, welche endosomolytisch wirken und die Transfektion von DNA verstärken.

Die vorgeschlagene Lösung besteht in der Bereitstellung von Peptiden aus CVB3. Die Beschreibung der vorliegenden Anmeldung gibt jedoch keine Hinweise, ob die vorgeschlagenen Peptide die genannte Aufgabe wirklich lösen. Es wird nicht gezeigt, ob die spezifischen Peptide der SEQ ID Nr. 1-10 tatsächlich endosomolytisch wirken und dadurch die Transfektionseffizienz verstärken. Es wird lediglich darauf hingewiesen, dass "erste Ergebnisse aus dem Labor der Erfinder zeigen, dass durch die (...) Peptide gemäss Beispiel 4 eine Transfektion vermittelt werden kann, deren Effizienz oberhalb der Effizienz von Adenovirus-vermittelter Lipofektion liegt." (S. 25, zweiter Abschnitt).

Diese Aussage reicht nicht aus, um glaubwürdig zu machen, dass besagte Peptide tatsächlich die Lipofektion verstärken. Es fehlen die notwendigen Kontrollversuche, d.h. der Vergleich der Effizienz der Lipofektion mit oder ohne die Peptide. Der Vergleich mit Adenovirus vermittelter Lipofektion kann nicht ausreichen, denn dabei handelt es sich um unabhängige, aus dem Stand der Technik bekannte Werte. Ausserdem bestehen offenbar die (nicht gezeigten) "ersten Ergebnisse" aus sehr vorläufigen und nicht durch Wiederholung erhärteten Daten.

Aus dem Vorhergehenden folgt deshalb, dass die Anmelder nicht glaubwürdig gezeigt haben, ob die der Anmeldung zugrundeliegende Aufgabe tatsächlich gelöst wurde. Unter diesen Umständen kann erfinderische Tätigkeit im Sinne von Art. 33 (3) PCT nicht anerkannt werden.

- 2.2 Selbst wenn man von den Argumenten unter 2.1 absieht, d.h. wenn man davon ausgehen würde, dass die der Anmeldung zugrundeliegende Aufgabe durch die vorgeschlagenen Peptide gelöst wäre, könnte erfinderische Tätigkeit immer noch nicht anerkannt werden aus den folgenden Gründen:

In D4 wird bereits ein membran-aktives Peptid zur Verwendung in DNA-Transfektion beschrieben (Tabellen 1 und 2). Ausserdem wurde auch in D6 gezeigt, dass ein Peptid aus dem VP1 protein von HRV2, einem nahen Verwandten von Coxsackieviren, die Transfektionseffizienz verstärkt (Fig. 7). Ausgehend von D4, welches den nächstliegenden Stand der Technik dokumentiert, ist deshalb die Aufgabe der vorliegenden Anmeldung die Bereitstellung weiterer endosomolytischer Peptide aus dem Coxsackievirus. Die Lösung dieser Aufgabe erfordert aber nichts weiter als eine zufällige Auswahl von Peptiden aus einer grossen Anzahl möglicher Peptide, die von der Sequenz der Proteine in D5 abgeleitet werden können.

Um erfinderische Tätigkeit zu erlangen, müsste gezeigt werden, dass die Peptide den Kriterien einer Auswählerfindung genügen. Es müsste also gezeigt werden, dass die erfindungsgemässen Peptide einen überraschenden, unerwarteten technischen Effekt zeigen, der sie gegenüber der Vielzahl möglicher Peptide auszeichnet. Oder aber, es müsste gezeigt werden, dass nur wenige Peptide aus der gesamten Sequenz überhaupt einen endosomolytischen Effekt zeigen.

In der Beschreibung wird jedoch nirgends gesagt, wie die spezifischen Peptidesequenzen ausgewählt wurden. Es sind also keinerlei Hinweise zu finden, dass die erfindungsgemässen Peptide durch eine erfinderische Auswahl im erläuterten Sinne gefunden wurden. Deshalb kann erfinderische Tätigkeit nach Art. 33 (3) im vorliegenden Fall nicht anerkannt werden.

3. Aus der vorhergehenden Analyse zur erfinderischen Tätigkeit unter 2.1 folgt zwangsläufig, dass der Gegenstand der Ansprüche 1, 2, 4, 7-10, 12-16 nicht industriell anwendbar im Sinne von Art. 33 (4) und Regel 5.1 ist. Regel 5.1 (vi) verlangt, dass anzugeben ist, "in welcher Weise der Gegenstand der Erfindung gewerblich verwertet, hergestellt und verwendet werden kann". Da nicht gezeigt wurde, dass die erfindungsgemässen Peptide die Transfektionseffizienz erhöhen, ist nicht klar, wofür besagte Peptide verwendet werden könnten. Die Angaben in der Beschreibung begrenzt sich lediglich auf die

spekulative Annahme einer bestimmten Funktion. Die Beschreibung enthält deshalb keine Informationen, die der Fachmann nicht selbst aus der Sequenz hätte ableiten können. Diese Informationen alleine genügen nicht, um zu versichern, dass die Peptide eine unmittelbare Anwendung haben.

Nur die Herstellung von Peptiden ohne Nutzbarkeit wird nicht als gewerbliche Anwendung angesehen, denn es macht natürlicherweise keinen Sinn, Peptide ohne bekannte Anwendung herzustellen.

Zu Punkt VIII

Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

1. Die Ansprüche 1, 2 entsprechen nicht den Erfordernissen des Artikels 6 PCT, weil der Gegenstand des Schutzbegehrens nicht klar definiert ist. In den Ansprüchen wird versucht, den Gegenstand durch das zu erreichende Ergebnis zu definieren; damit wird aber lediglich die zu lösende Aufgabe angegeben.
2. Im Anspruch 4 und den hierauf Bezugnehmenden Ansprüchen ist nicht klar, wie weit der Schutzzumfang reicht. Die Peptide, denen "gegenüber den Peptiden aus a) eine oder mehrere der Aminosäuren fehlen oder gegen eine andere ausgetauscht sind", sind nicht präzise genug definiert. Der Schutzzumfang wird dadurch unbegrenzt und nicht klar vom Stand der Technik unterscheidbar.
3. Anspruch 12 betrifft die Verwendung eines Peptids in der Gentherapie. Für die Beurteilung der Frage, ob der Gegenstand des besagten Anspruchs gewerblich anwendbar ist, gibt es in den PCT-Vertragsstaaten keine einheitlichen Kriterien. Die Patentierbarkeit kann auch von der Formulierung der Ansprüche abhängen. Das EPA beispielsweise erkennt den Gegenstand von Ansprüchen, die auf die medizinische Anwendung einer Verbindung gerichtet sind, nicht als gewerblich anwendbar an; es können jedoch Ansprüche zugelassen werden, die auf eine bekannte Verbindung zur erstmaligen medizinischen Anwendung und die Verwendung einer solchen Verbindung zur Herstellung eines Arzneimittels für eine neue medizinische Anwendung gerichtet sind.

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12N 15/86, 15/87, 15/88, 7/01, 7/04, C07K 14/085, A61K 48/00	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/65075 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 2. November 2000 (02.11.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/03588 (22) Internationales Anmeldedatum: 20. April 2000 (20.04.00) (30) Prioritätsdaten: 199 18 446.1 23. April 1999 (23.04.99) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): EBERHARD-KARLS-UNIVERSITÄT TÜBINGEN UNIVERSITÄTSKLINIKUM [DE/DE]; Geissweg 3, D-72076 Tübingen (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KÜPPER, Jan-Heiner [DE/DE]; Bachstrasse 11, D-72127 Kusterdingen (DE). KANDOLF, Reinhard [DE/DE]; Untere Dornäcker 49, D-72379 Hechingen (DE). SELINKA, Hans-Christoph [DE/DE]; Marktstrasse 13, D-72145 Hirmlingen (DE). (74) Anwälte: OTTEN, Hajo usw.; Witte, Weller & Partner, Postfach 105462, D-70047 Stuttgart (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(54) Title: USE OF COXSACKIE VIRUSES FOR IMPROVING CELL TRANSFECTION (54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON COXSACKIEVIREN ZUR VERBESSERUNG DER TRANSFEKTION VON ZELLEN (57) Abstract The invention relates to non-infectious particles or peptides derived from the Cocksackie virus which are suited to endosomolytic action and/or endocytose reinforcement in a cell transfection. (57) Zusammenfassung Es werden von dem Cocksackievirus abgeleitete, nicht infektiöse Partikel oder Peptide beschrieben, die dazu geeignet sind, im Rahmen einer Transfektion von Zellen endosomolytisch zu wirken und/oder die Endocytose zu verstärken.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verwendung von Cocksackieviren zur Verbesserung
der Transfektion von Zellen

Die vorliegende Erfindung beschäftigt sich allgemein mit der Verwendung von Cocksackieviren (im folgenden: CV) zur Verbesserung der Transfektion von Zellen.

Cocksackieviren gehören zur Familie der Picornaviridae und werden in die Subgruppe A mit den Serotypen 1-22 und 24 sowie die Subgruppe B mit den Serotypen 1-6 eingeteilt. Während im Rahmen der Erfindung allgemein von Cocksackieviren ausgegangen wird, beschäftigt sich die Erfindung im Besonderen mit Cocksackieviren der Subgruppe B, vorzugsweise des Serotyps B3.

Unter Transfektion wird im Rahmen der vorliegenden Anmeldung nicht nur das Einbringen von DNA oder RNA in Zellen, sondern auch das Einbringen von Peptiden in Zellen verstanden. Die Transfektion kann somit zu therapeutischen, diagnostischen oder prophylaktischen Zwecken, insbesondere einer Gentherapie eingesetzt werden.

Besonderes Augenmerk richtet die vorliegende Erfindung auf die Diagnose, Behandlung und Prävention von kardialen Erkrankungen, die insbesondere in den Industrienationen eine immer größere Bedeutung erlangen. Nachdem bereits verschiedene Gene für kardiale Erkrankungen identifiziert wurden und es allgemein erwartet wird, daß eine Vielzahl von pathologischen Genen, die Herzerkrankungen auslösen können, in den nächsten Jahren noch identifiziert werden, ist die Entwicklung von Herzmuskel-spezifischen Gentransfersystemen zur selektiven Modulation der endogenen Genaktivität kardialer Myozyten für die zukünftige Behandlung einer Vielzahl von angeborenen und erworbenen Herzmuskelerkrankungen von großer klinischer Bedeutung. Ideale Vektorsysteme für die kontrollierte Modulation der endogenen Genaktivitäten kardialer Myozyten stehen jedoch bisher nicht zur Verfügung.

Für die Transfektion von Zielzellen des kardiovaskulären Systems wurden zwar bereits verschiedene Techniken beschrieben, diese weisen jedoch alle spezifische Nachteile auf. In präklinischen Studien zur somatischen Gentherapie kardiovaskulärer Erkrankungen wurden bislang insbesondere replikationsdefekte rekombinante Adenoviren angesetzt, mit denen eine hinreichende Transfektionseffizienz erreicht wird (Barr et al., Gene Therapy 1, 1994, 51). Im Gegensatz zu rekombinanten

Adenoviren ist die Applikation von retroviralen Konstrukten (Nabel EG et al., Science 249, 1990, 1285) sowie von Lipid/DNA/Komplexen (Nabel EG et al., Science 244, 1989, 1342) durch die niedrige Transfektionseffizienz des Gentransfers limitiert. Trotz der Vorteile des Adenovirus-vermittelten Gentransfers bezüglich der hohen Genexpression liegen die Nachteile dieses Verfahrens in der aus der Literatur bekannten Komplementierung replikationsinaktiver Konstrukte, der Multiorganotropie von Adenoviren sowie der möglichen Induktion einer T-Zell-vermittelten Immunantwort.

Felgner et al., PNAS, Band 84, Seiten 7413-7417, 1987 beschreiben eine Lipofektion genannte Transfektion von DNA in Zellkulturzellen, bei der eine Liposomenformulierung aus dem kationischen Lipid N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-n,n,n-Trimethylammoniumchlorid (DOTMA) und Dioleoyl-Phosphatidylethanolamin (PtdEtn) verwendet wird. Die zu transferierende DNA interagiert spontan mit der Liposomenformulierung, und es bilden sich Lipid-DNA-Komplexe. Die Fusion des Komplexes mit Zellkulturzellen führt zu einer effizienten Aufnahme und Expression der DNA.

Diese Liposomenformulierung wird von GIBCO/BRL unter dem Handelsnamen LIPOFECTIN® vertrieben. Die mitgelieferten Herstellerinformationen, in denen PtdEtn mit DOPE bezeichnet wird, geben detaillierte Anweisungen für die Durchführung der Lipofektion an.

Mittlerweile ist Lipofektion eine anerkannte Methode, um rekombinante DNA in Zellen einzuschleusen und dort zu exprimieren. Da die Lipofektion in bezug auf Sicherheit viralen Vektor-

systemen überlegen ist, wird zunehmend versucht, diese Technik auch für die Gentherapie von Stoffwechsel- oder Tumorerkrankungen einzusetzen. Die Effizienz ist jedoch bei den meisten Anwendungen gering, insbesondere bei Primärkulturen oder in vivo-Applikationen sind die bekannten Liposomen-Systeme bisher nicht gut geeignet.

Ein weiterer Ansatz geht von der Erkenntnis aus, daß viele Viren über zelluläre Rezeptoren aufgenommen werden, auf natürlichem Weg in zytoplasmatische Endosomen gelangen und von dort ihren Replikationszyklus antreten, nachdem die Endosomen aufgebrochen wurden. Diese endosomolytische Wirkung nutzen Cotten et al., PNAS Band 89, Seiten 6094-6098, 1992 aus und verwenden replikationsinkompetente Adenoviren als endosomolytisches Agens zusammen mit Transferrin als Ligand für die Zielzellrezeptoren.

Wagner et al., PNAS Band 89, Seiten 7934-7938, 1992 zeigen, daß Peptidfragmente eines Influenzavirus endosomolytisch wirken. Als synthetisches, virusartiges Gentransfervehikel verwenden sie DNA-Komplexe aus Poly-Lysin zum Verpacken der DNA, Poly-Lysin-modifiziertem Transferrin als Ligand für die Zelloberflächenrezeptoren sowie Poly-Lysin-gebundene Influenza-peptidfragmente als endosomolytisches Agens.

Die beschriebenen Verfahren sind zum einen sehr aufwendig und damit für Standardanwendungen nicht geeignet. Bei den beiden zuletzt beschriebenen Verfahren werden darüber hinaus sehr große Peptidmengen benötigt, was aufgrund der starken Immunogenität bei in vivo-Applikationen ungünstig und aufgrund der teuren Herstellung darüber hinaus auch für in vitro-Anwendungen ungeeignet ist.

Einen weiteren Ansatz beschreiben Kern et al. in "Coxsackievirus-verstärkter endosomolytischer Gentransfer in kontraktile Kardiomyozyten", Verh. Dtsch. Ges. Path. Band 81, Seite 611, 1997. Ausgehend von der Erkenntnis, daß das Coxsackievirus einen bisher unverstandenen Tropismus in das Herz aufweist, setzen sie bei der Lipofektion durch UV-Strahlung replikationsinkompetente CVB3-Partikel für den Gentransfer in Kardiomyozyten ein. Bei CVB3, einem Coxsackievirus der Subgruppe B mit Serotyp 3 handelt es sich um ein Picornavirus mit einem einzelsträngigen RNA-Genom positiver Polarität und einer Genomgröße von nur 7,4 kb. Zum Vergleich, Adenoviren haben eine Genomgröße von 48 kb.

Das Verfahren, durch UV-Strahlung replikationsinkompetente CVB3-Partikel herzustellen, ist jedoch nicht hinreichend sicher. Es ist nämlich nach Erkenntnis der Erfinder der vorliegenden Anmeldung nicht auszuschließen, daß einige Viruspartikel überleben und dann eine produktive Infektion in den Zielzellen einleiten.

Kandolf und Hofschneider, PNAS, Band 82, Seiten 4818/4822, 1985, beschreiben eine CVB3-Variante mit ausgeprägtem Tropismus für das Herz. Die vollständige Nukleotidsequenz der cDNA dieser infektiösen CBV3-Variante ist beschrieben bei Klump et al., Journal of Virology, 1990, Seiten 1573-1783. Es wird berichtet, daß das cDNA-abgeleitete Virus denselben Tropismus und dieselbe Plaque-Morphologie aufweist wie der Wildtyp.

Kern et al. (a.a.O.) beschreiben, daß durch das inaktivierte CVB3 eine Verstärkung der durch die Liposomenformulierung DOTAP (Böhringer) vermittelten Transfektion erfolgt. Die maximale

Transfektionseffizienz wird für die Verwendung von 10 pfu (Plaque-bildende Einheiten) an inaktiviertem CVB3 pro Zelle berichtet, sie lag für das Reportergen der β -Galactosidase bis zu 6-fach höher als bei einer Transfektion der Reportergen-konstruktion ausschließlich mit DOTAP.

Obwohl aus der Veröffentlichung von Kern et al. bekannt ist, daß die CVB3-verstärkte DOTAP-vermittelte Lipofektion dazu führt, daß die transfizierte DNA schneller aus den Endosomen in das Zytosol gelangt, ist die beschriebene Effizienz sowie der hohe Einsatz von CVB3 aus immunologischen Gründen noch nicht zufriedenstellend.

Hiervon ausgehend ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, für eine Steigerung der Effizienz der Transfektion von Zellen zu sorgen, wobei das Verfahren gleichzeitig preiswert, sicher und immunologisch unbedenklich sein soll.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe gelöst durch von dem Coxsackievirus, vorzugsweise von CVB abgeleitete, nicht infektiöse Partikel oder Peptide, die dazu geeignet sind, im Rahmen einer Transfektion von Zellen endosomolytisch zu wirken oder die Endocytose zu verstärken.

Die Partikel sind dabei ausgewählt aus der Gruppe

- a) leere CV-, vorzugsweise CVB-Kapsidpartikel,
- b) durch Abspaltung von Virusprotein 4 entstandene CV-, vorzugsweise CVB-A-Partikel,

- c) CV-, vorzugsweise CVB-Proviruspartikel, bei denen die Virusproteine 2 und 4 noch fusioniert sind,
- d) modifizierte Formen der Partikel aus a), b) oder c),
- e) durch genetische Modifikation replikationsinkompetente CV-, vorzugsweise CVB-, weiter vorzugsweise CVB3-Partikel.

Das Peptid, das vorzugsweise weniger als 30 Aminosäuren umfaßt, ist dabei vorteilhafterweise ausgewählt aus der Gruppe:

- a) Peptide mit den Aminosäuresequenzen SEQ ID Nr. 1, SEQ ID Nr. 2, SEQ ID Nr. 3, SEQ ID Nr. 4, SEQ ID Nr. 5, SEQ ID Nr. 6, SEQ ID Nr. 7, SEQ ID Nr. 8, SEQ ID Nr. 9, SEQ ID Nr. 10 aus dem beiliegenden Sequenzprotokoll,
- b) Peptide, bei denen gegenüber den Peptiden aus a) eine oder mehrere der Aminosäuren fehlen oder gegen eine andere ausgetauscht sind, und
- c) Peptide oder Polypeptide, die die Aminosäuresequenz eines der Peptide aus a) oder b) umfassen.

Die der Erfindung zugrunde liegende Aufgabe wird auf diese Weise vollkommen gelöst.

Die Erfinder der vorliegenden Anmeldung haben nämlich erkannt, daß von dem CV, vorzugsweise CVB, weiter vorzugsweise dem CVB3 abgeleitete Partikel oder Peptide für den Gentransfer eingesetzt werden können, da sie endosomolytisch wirken

und/oder die Endocytose verstärken. Das Verfahren der Transfektion wird durch die Verwendung dieser Partikel und/oder Peptide zum einen sehr preiswert, da sich äußerst hohe Ausbeuten bei der Herstellung ergeben, eine sehr einfache Reinigung möglich ist, sowie sehr kleine Peptide/Partikel eingesetzt werden, die eine wesentlich geringere Anzahl immunogener Epitope als Adeno- oder Influenzaviren haben. Die Erfinder konnten zeigen, daß sich bei sehr viel geringeren Peptidmengen als bei Adenoviren optimale biologische Effekte ergeben, die größere biologische Wirksamkeit geht ferner einher mit einer Herabsetzung der Immunogenität.

Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung der Partikel und Peptide besteht darin, daß diese in jedem Fall nicht infektiös sind, wobei in vielen Fällen auch auf die UV-Bestrahlung zur Inaktivierung der RNA verzichtet werden kann.

Gegenüber dem von Kern et al. (a.a.O.) beschriebenen Einsatz von inaktivierten CVB3 Partikeln bei der Lipofektion war zunächst unerwartet, daß auch die abgeleiteten Peptide und Partikel zu einer Verstärkung der Transfektion führten. Es zeigte sich sogar, daß die Effizienz größer ist als bei inaktivierten CVB3.

Erfindungsgemäß weist ein Verfahren zur Erzeugung eines derartigen Partikels die Schritte auf:

- Isolieren von nativen CV-, vorzugsweise CVB-Partikeln,

- Erhitzen der isolierten CV-, vorzugsweise CVB-Partikel für 5-20 min, vorzugsweise ca. 10 min, auf über 45°C, vorzugsweise ca. 51°C.

Versuche im Labor der Erfinder haben gezeigt, daß durch dieses Verfahren auf einfache Weise CV-A-Partikel erzeugt werden, bei denen das Virusprotein 4 abgespalten wurde.

Alternativ können CV-A-Partikel auch mit dem folgenden Verfahren hergestellt werden:

- Bereitstellen einer Matrix mit gekoppeltem CV-Rezeptor,
- Beschicken der Matrix mit nativen CVB3-Partikeln, und
- Eluieren der Matrix.

Hier wird von der Tatsache Gebrauch gemacht, daß das Virusprotein 4 nach der Interaktion des CV mit dem zellulären Rezeptor abgespalten wird, so daß nur noch das verbleibende CV-A-Partikel internalisiert wird, das nicht infektiös ist und nach Erkenntnis der Anmelder endosomolytisch wirkt.

Vor diesem Hintergrund betrifft die vorliegende Erfindung ferner ein Verfahren zur Transfektion von Zellen, vorzugsweise von kardialen Myozyten mit einem Polyanion, vorzugsweise einer therapeutischen Gensequenz, bei dem zur Verstärkung der Transfektion zumindest ein Partikel oder Peptid der oben genannten Art eingesetzt wird, wobei vorzugsweise vor der Transfektion ein Komplex aus dem Polyanion, dem Peptid sowie einem kationischen Lipid, vorzugsweise DOTMA gebildet wird.

Während die erwähnten Partikel und Peptide allgemein endosomolytisch wirken, also für eine hohe Effizienz des neuen Verfahrens sorgen, besteht ein besonderer Vorteil bei der Lipofektion von kardialen Myozyten. Die Erfinder haben nämlich erkannt, daß die Endosomolyse organspezifische Aspekte haben kann, so daß die Verwendung von Partikeln und Peptiden, die von dem CV, vorzugsweise dem CVB3 abgeleitet sind, für den Gentransfer am Herzmuskel die Methode der Wahl ist. Es hat sich gezeigt, daß andere Viren bei weitem nicht so effizient sind, insbesondere haben Adenoviren keine Möglichkeit, dieses Organ so effizient zu besiedeln wie z.B. der kardiotrophe CVB3.

Das transfizierte Polyanion kann dabei eine DNA, eine RNA oder ein entsprechend geladenes Protein mit therapeutischer Wirkung sein.

Vor diesem Hintergrund betrifft die Erfindung ferner ein Verfahren zur Formulierung von Komplexen für den Transfer von Polyanionen, vorzugsweise einer therapeutischen Gensequenz in Zellen, vorzugsweise kardiale Myozyten, bei dem das Polyanion mit zumindest einem Peptid oder Partikel der oben genannten Art inkubiert wird.

Dabei ist es bevorzugt, wenn das Peptid vor der Inkubation mit dem Polyanion mit einem kationischen Lipid, vorzugsweise mit DOTMA, vorinkubiert wird.

Dieses Verfahren ist besonders effizient, preiswert und einfach durchzuführen, die einzelnen Agenzien sind lediglich der Reihe nach miteinander zu vermischen und für kurze Zeit zu inkubieren, wobei sich spontan der gewünschte Komplex bildet.

Derartige Komplexe sind somit einfach und damit preiswert herzustellen sowie immunologisch unbedenkliche Vehikel für den Transfer von diagnostisch, therapeutisch oder prophylaktisch wirkenden Agenzien in Zellen insbesondere des Herz-Kreislauf-Systems.

Vor diesem Hintergrund betrifft die vorliegende Erfindung auch die Verwendung eines Peptides oder Partikels der vorstehend genannten Art für die Therapie, Diagnostik oder Prophylaxe von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, insbesondere von Kardiomyopathien.

Des weiteren betrifft die Erfindung die Verwendung eines Peptides oder Partikels der vorstehend genannten Art als Agens zur Verbesserung der Transfektion von Zellen, vorzugsweise kardialen Myozyten, insbesondere zur Verbesserung der Lipofektion bei der Gentherapie.

Die gefundenen Peptide und Partikel lassen sich nicht nur im wissenschaftlichen Bereich oder bei der Einzelzubereitung einsetzen, sie sind vielmehr auch geeignet für den allgemeinen Einsatz auch in weniger spezialisierten Krankenhäusern oder Arztpraxen.

Vor diesem Hintergrund betrifft die vorliegende Erfindung auch eine therapeutische Zusammensetzung mit einem Peptid oder Partikel der vorstehend genannten Art, sowie einen Kit für die Formulierung von transfizierbaren Komplexen, insbesondere für die Gentherapie, der ein Peptid oder Partikel der vorstehend genannten Art enthält.

Derartige therapeutische Zusammensetzungen und Kits können die Partikel und/oder Peptide in Stammlösungen oder bereits in Endkonzentrationen enthalten, wobei im Kit ferner die weiter benötigten Reagenzien, z.B. die Liposomenformulierung vorhanden sein können.

Die Peptide und Partikel lassen sich zum einen enzymatisch durch Verdau von Viruspartikeln erzeugen, zum anderen aber auch auf gentechnische Weise.

Vor diesem Hintergrund betrifft die Erfindung ferner einen replizierbaren Expressionsvektor, der eine Gensequenz enthält, die auf exprimierbare Weise für ein Peptid oder Partikel der vorstehend genannten Art kodiert.

Ferner betrifft die Erfindung ein DNA-Isolat mit einer DNA-Sequenz, die für das Peptid oder Protein der vorstehend genannten Art kodiert.

Auf diese Weise ist es möglich, die Peptide und Partikel im großtechnischen Maßstab durch mikrobiologische Verfahren oder in vitro-Translation zu erzeugen.

Wenn durch genetische Manipulation replikationsinkompetente Viruspartikel eingesetzt werden, ergibt sich zum einen eine sehr hohe Sicherheit, denn diese Partikel können nur noch in einer Helferzelle repliziert werden, die die zerstörten Funktionen *in trans* zur Verfügung stellt. Diese Partikel können dann auch ohne weitere Inaktivierung durch UV-Bestrahlung oder thermische Behandlung für die Lipofektion eingesetzt werden.

Die Herstellung der replikationsinkompetenten Viruspartikel erfolgt zum Beispiel durch Deletion von kodierenden Genomsequenzen, vorzugsweise der VP2- und VP3-Region, die die Informationen für die replikationsrelevanten Proteine enthalten. Andererseits können diese replikationsrelevanten Genfunktionen auch durch Punktmutationen zerstört werden. Die deletierten Sequenzen werden durch andere Sequenzen, vorzugsweise nicht-kodierende Sequenzen ersetzt, um die optimale Genomgröße für die Verpackung wieder herzustellen. Die deletierten oder mutierten Genomsequenzen werden dann erfindungsgemäß in Helferzellen zur Verfügung gestellt.

Vor diesem Hintergrund betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Vektorplasmid mit zumindestens einer DNA-Sequenz, die für ein genetisch modifiziertes CV-, vorzugsweise CVB-, weiter vorzugsweise CVB3-Genom kodiert, bei dem Anteile der kodierenden Sequenz ausgetauscht oder verändert sind, so daß das Virusgenom nicht infektiös ist, und mit einem der DNA-Sequenz vorgeschalteten Promotor. Ferner betrifft die Erfindung ein Helferkonstrukt zum Komplementieren der bei dem Vektorplasmid veränderten oder ausgetauschten Anteile der kodierenden Sequenz des Virusgenoms.

Dieses Helferkonstrukt kann dabei ein Helferplasmid, ein viraler Vektor oder eine Helferzelle sein, die stabil mit für mindestens eine der ausgetauschten oder veränderten Sequenzen kodierender Helfer-DNA transfiziert ist.

Zur Herstellung von durch genetische Manipulation replikationsinkompetenten Viruspartikeln werden Wirtszellen mit

dem Vektorplasmid transfiziert, wobei die ausgetauschten oder veränderten Sequenzen in der Wirtszelle durch das Helfer-Konstrukt komplementiert werden.

Auf diese Weise können einfach und reproduzierbar zuverlässig replikationsinkompetente Viruspartikel erzeugt werden, die im Rahmen einer Transfektion von Zellen endosomolytisch wirken bzw. die Endocytose verstärken.

Weitere Merkmale und Vorteile der Erfindung ergeben sich aus der nachfolgenden Beschreibung bevorzugter Ausführungsbeispiele.

Beispiel 1: CVB3-Genom und -cDNA

Coxsackieviren sind Vertreter des Genus Enteroviren in der Familie der Picornaviren. Unter natürlichen Bedingungen erzeugen Coxsackieviren nur im Menschen Krankheiten, die initiale Isolierung von Coxsackieviren gelingt jedoch am besten in neugeborenen Mäusen, die auch zur Differenzierung der Viren in zwei Gruppen dienen:

Die Gruppe A mit 23 Serotypen und die Gruppe B mit 6 Serotypen.

CVB, vor allen Dingen CVB3, gelten als häufige Erreger von viralen Herzmuskelentzündungen, die sich sowohl in dieser akuten Form wie auch in chronischen Verläufen äußern können. Bei Säuglingen verläuft die Myocarditis oft tödlich.

Wie alle Picornaviren haben auch Coxsackieviren ikosaedrische Nukleokapside, die aus vier Virusproteinen VP1, VP2, VP3 und VP4 bestehen. Während die Proteine VP1, VP2 und VP3 die äußere Hülle bilden, ist VP4 an der Innenseite der Partikel lokalisiert und mit dem einzelsträngigen RNA-Genom assoziiert. Das Genom ist per se infektiös; wird es unter geeigneten Bedingungen in einer Zelle aufgenommen, so kann schon die gereinigte RNA eine Infektion induzieren, denn sie besitzt Plusstrangorientierung, die Virusproteine können also ohne Zwischenschritt von der RNA translatiert werden. Das 3'-Ende der genomischen RNA ist polyadenyliert, an das 5'-Ende ist kovalent ein kleines, viruskodiertes Protein V_{pg} gebunden.

Ein schematisches Beispiel für das CVB3-Genom ist in Fig. 1 dargestellt. Das Genom enthält einen einzigen, offenen Lese-rahmen, der für ein Vorläuferprotein kodiert. Dieses Polyprotein wird noch während seiner Synthese proteolytisch in die verschiedenen viralen Komponenten gespalten.

Aus dem Polyprotein gehen die bereits erwähnten Kapsidproteine VP1-VP4 in angegebener Weise aus den Bereichen 1A bis 1D und das V_{pg} aus dem Bereich 3B hervor. Die Bereiche 2A und 3C kodieren für Proteasen, die das Polyprotein aufspalten. Die aus den Bereichen 2B und 2C hervorgehenden Proteine stehen mit der Wirtsspezifität der Viren in Verbindung.

Der Bereich 3D kodiert für eine RNA-abhängige RNA-Polymerase, die in der Wirtszelle die Replikation des RNA-Genomes durchführt.

Am 5'- und 3'-Ende enthält das Genom noch nicht translatierte Bereiche (NTR), wobei der NTR-Bereich am 5'-Ende eine ausgeprägte Sekundärstruktur aufweist und die Bindung von Ribosomen ermöglicht, also die Translation des Genoms in das Polyprotein erlaubt.

Die vollständige Nukleotidsequenz einer cDNA einer infektiösen CVB3-Variante mit ausgeprägtem Tropismus für das Herz ist beschrieben bei Klump et al. (a.a.O.). Diese infektiöse cDNA von CVB3 steht in dem Konstrukt pCB3/T7 aus Klump et al. oder dem von den Erfindern neu bereitgestellten Konstrukt pcMV-CVB3 zur Verfügung. Vor dem 5'-Ende befindet sich ein Promotor (Prom), der die Transkription der cDNA in das RNA-Genom ermöglicht.

Beispiel 2: Reinigung von CVB3-Partikeln

Zellkulturen mit konfluent gewachsenen Kardiomyozyten werden mit 1 - 5 infektiösen Einheiten (PFU) CVB3 infiziert. Nach einigen Stunden ist der zytopathische Effekt erkennbar.

Nach 6 - 12 Stunden werden die Zellkulturüberstände sowie die Zellen geerntet.

Die Viren werden durch übliche Gefrier/Tau-Lyse aus den Zellen freigesetzt. Diese Virussuspension wird zunächst durch Zentrifugation bei 1.500 Upm von Zelltrümmern gereinigt.

Der virushaltige Überstand wird auf 10 ml eines 5 - 30 % Saccharosegradienten geschichtet und ultrazentrifugiert. Dadurch ergibt sich eine Trennung von nativen Virionen

(Sedimentationskoeffizient 160 S), CVB3-A-Partikeln (135 S) und Proviren (125 S). Proviren sind unvollständig maturierte Viren, die bei jeder Präparation in großer Menge vorliegen und sich durch noch nicht erfolgte Spaltung des VP0-Proteins in VP2 und VP4 auszeichnen.

A-Partikel entstehen aus nativen Virionen durch Abspaltung des Virusproteins 4, einem bei der Infektion natürlicherweise ablaufenden Vorgang. Sie sind dann nicht mehr infektiös, jedoch in einer Zelle noch vermehrbar.

Die erfahrungsgemäß in den ersten fünf Fraktionen zu findenden infektiösen Partikel werden durch Western-Blot-Analyse auf die Anwesenheit der viralen Partikel untersucht.

Zur Elimination der Saccharose aus den Viruspräparationen werden die relevanten Einzelfraktionen gegen PBS/20 mM MgCl₂ für 24 Stunden bei 4°C dialysiert.

Die gereinigten Virusstocks werden bei -20°C gelagert. Verdünnungen dieser Virusstocks werden auf Wirtszellen ausgesät, um den Virustiter in einem üblichen Plaque-Test zu überprüfen.

Zur Inaktivierung der CVB3-Viren wird der Virusstock in eine Petrischale gefüllt und 30 - 60 min mit UV-C bestrahlt. Dabei werden die Nukleinsäuren der Viren geschädigt, nicht aber die biologisch aktiven Proteine.

Beispiel 3: Erzeugung von CVB3-A-Partikeln

In den gemäß Beispiel 2 hergestellten Fraktionen finden sich nur geringe Mengen an CVB3-A-Partikeln, so daß diese auf die beiden folgenden Weisen aus infektiösen CVB3-Partikeln hergestellt werden können:

- A) native Virionen werden für 10 min bei 51°C erhitzt und gehen dabei quantitativ in CVB3-A-Partikel über.

Auf diese Weise steht ein Verfahren zur Verfügung, mit dem beliebig große Mengen dieser sonst nur in limitierenden Mengen von infizierten Zellen freigesetzten Partikel erzeugt werden können.

- B) Die Alternative beruht auf einer Säulenaufreinigung, bei der rekombinante CVB3-Rezeptoren an eine Matrix gekoppelt werden. Die Säule wird dann mit aktiven CVB3-Partikeln geladen, die mit dem Rezeptor interagieren und dabei das Virusprotein 4 verlieren. Durch die Elution der Säule lassen sich die CVB3-A-Partikel gewinnen.

Beispiel 4: Endosomolytische Aktivität

Es konnte gezeigt werden, daß die CVB3-verstärkte Lipofektion unabhängig vom Rezeptor ist, so daß bei der Lipofektion keine A-Partikel erzeugt werden. A-Partikel sind jedoch die bei einer Rezeptor-abhängigen Infektion natürlicherweise entstehenden Partikel und haben eine höhere endosomolytische Aktivität als

native Virionen. Daher sind die Ergebnisse, die mit der durch A-Partikel verstärkten Lipofektion erzielt werden, besser als die von Kern et al. beschriebene Lipofektion mit nativen Virionen.

Die eindeutige endosomolytische Aktivität von CVB3 konnte dadurch nachgewiesen werden, daß die CVB3-vermittelte Verstärkung der Lipofektion durch Bafilomycin, einem spezifischen Inhibitor der endosomalen Protonen-Pumpe (Bowman et al., PNAS, Band 85, Seiten 7972-7962, 1988; Drose et al., Biochemistry, Band 32, Seiten 3902-3906, 19993) wieder aufgehoben wird. Die Infektion von Zellen mit CVB3 läßt sich durch Bafilomycin jedoch nicht hemmen.

Peptide aus der Kapsidregion von CVB3, die endosomolytisch aktiv sind, sind in der folgenden Tabelle abgedruckt:

Tabelle 1: CVB3-Peptide mit endosomolytischer Aktivität. Hydrophile saure bzw. basische Aminosäuren sind fett gedruckt.

Peptidsequenz		Kapsidregion
SEQ ID Nr. 1	RVVYNAGMGVGNLTIF	VP2
SEQ ID Nr. 2	LPTMNTPGSCQFLTSDD	VP3
SEQ ID Nr. 3	KLTFMFCGSAMATG	VP3
SEQ ID Nr. 4	LTFMFCGSAMATGK	VP3
SEQ ID Nr. 5	KFLLAYSPPGAGAP	VP3
SEQ ID Nr. 6	FLLAYSPPGAGAPTKRVD	VP3
SEQ ID Nr. 7	ILTHQIMYVPPGGPVDKVD	VP1
SEQ ID Nr. 8	DKVDSYVWQTSTNPSVFW	VP1
SEQ ID Nr. 9	VYGINTLNNMGTLYARH	VP1
SEQ ID Nr. 10	YGVWRDYLKDSEATAEDQ	VP2

Bei den Peptiden kann das Problem bestehen, daß sie sich aufgrund ihrer amphipathischen Eigenschaften nur schwer mit Liposomen kombinieren lassen, denn diese werden dadurch zerstört. Dieses Problem kann dadurch gelöst werden, daß einige saure Aminosäuren zusätzlich N-terminal oder C-terminal synthetisiert

werden, und das synthetische Peptid dann über eine positiv geladene Poly-Lysin-Brücke an die zu transferierende DNA gebunden wird. Dies hat den weiteren Vorteil, daß Transferrin-gekoppeltes Poly-Lysin verwendet werden kann, so daß eine effiziente Bindung an den Transferrin-Rezeptor möglich ist (Wagner, a.a.O.).

Beispiel 5: Replikationsinkompetente, genetisch modifizierte Viruspartikel

Ausgangspunkt für die Herstellung von genetisch modifizierten, replikationsinkompetenten Viruspartikeln ist ein Vektorplasmid, wie es in Fig. 2 dargestellt ist. Dieses Vektorplasmid enthält hinter einem Promotor eine DNA-Sequenz, die für das RNA-Genom aus Fig. 1 kodiert, wobei jedoch bestimmte Anteile des RNA-Genoms ausgetauscht oder z.B. durch Punktmutation derart verändert wurden, daß das RNA-Genom selbst nicht mehr infektiös ist.

In Fig. 2 ist das RNA-Genom aus Fig. 1 schematisch in einen ersten Anteil I sowie einen zweiten Anteil II aufgeteilt. Die Anteile I und II müssen nicht zwingend schematisch hintereinander angeordnet sein, sie können auch in beliebiger Reihenfolge mehrfach vorhanden sein.

Der Anteil I repräsentiert den ausgetauschten oder modifizierten Sequenzanteil, während der Anteil II das Rest-Genom aus Fig. 1 repräsentiert.

Die Vektorplasmide aus Fig. 2 werden dann mit Helfer-Konstrukten in Wirtszellen ko-transfiziert, um replikationsinkompetente Viruspartikel zu erzeugen. Damit diese Ko-Transfizierung zum Erfolg führt, müssen die Helfer-Konstrukte den ausgetauschten oder modifizierten Anteil I komplementieren.

Dies kann zum einen dadurch erfolgen, daß der Anteil I mittels spezifischer PCR-Primer aus dem in Beispiel 1 erwähnten Plasmid pCMV-CVB3 amplifiziert wird. Diese Amplifikate können mit einem viralen Vektor in Wirtszellen eingebracht werden, wobei andererseits eine Helferzelle auch stabil mit diesen Amplifikaten transfiziert werden kann. Auf diese Weise dienen die Helferzellen bei der Transfizierung mit Vektorplasmid als Wirtszellen und stellen in trans die fehlenden oder veränderten Anteile des Virusgenoms zur Verfügung.

Bevorzugt ist es jedoch, wenn die Helfer-Konstrukte ebenfalls Plasmide sind, die stabil oder transient in Wirtszellen transfiziert werden, um dann in RNA transkribiert zu werden, die wiederum translatierbar ist, um die Struktur- und Nichtstruktur-Proteine zu erzeugen, für die das Vektorplasmid selbst nicht kodiert.

Zu diesem Zweck ist es erforderlich, in z.B. das pCR-Script™-Plasmid einen Promotor, z.B. den CMV-Promotor, und eine IRES (internal ribosomal entry site) zu klonieren. Dahinter werden dann die Amplifikate mit den Anteilen I von CVB3 kloniert. Durch die IRES wird die Translationseffizienz der Helferanteile

erhöht, es kann z.B. die IRES von EMVC (Enzyphalomyocarditis-Virus), die EMCV-IRES von CLONETECH verwendet werden.

Auf diese Weise werden Helfer-Plasmide erzeugt, die in Bakterien verstärkbar und in RNA transcribierbar sind, die wiederum translatiert werden kann, um die Translationsprodukte der Vektor-Plasmide derart zu komplementieren, daß replikationsinkompetente Viruspartikel gebildet werden.

Dazu werden die Helferzellen, die transient oder stabil mit dem Helfer-Plasmid transfiziert sind, mit entsprechendem Vektor-Plasmid transfiziert, das dann durch die Wirtszelle *in trans* komplementiert wird.

Auf diese Weise entstehen replikationsinkompetente Viruspartikel, die nach entsprechender Aufreinigung verwendet werden können.

Ein Weg, der eine größere Variabilität ermöglicht, besteht darin, Wirtszellen mit dem Vektor-Plasmid aus Fig. 2 und dem entsprechenden, komplementierenden Helfer-Plasmid aus Fig. 3 zu ko-transformieren, wodurch die replikationsinkompetenten Viruspartikel entstehen.

Beispiel 6: CVB3-verstärkte Lipofektion

Als Zielzellen wurden Chinese-Hamster-Ovarian-Zellen (CHO), Rattenmyoblasten-Zellen (H9C2), humane Zervix-Karzinom-Zellen (HeLa), primäre humane Fibroblasten sowie primäre adulte Herzmuskelzellen des Schweins eingesetzt.

Am ersten Tag wurden 5×10^4 Zellen auf 24-Loch-Platten ausgesät. Am zweiten Tag wurden die folgenden Lösungen angesetzt:

Lösung A: 150 μ l Serum-freies Medium

5 μ l Lipofektin (GIBCO/BRL)

1 Partikel pro Zelle CVB3 bzw. 100 ng-10 μ g-Peptidlösung

Lösung A wird 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Lösung B: 1,5 μ g Plasmid-DNA (z.B. pCMVLacZ)

ad 150 μ l Serum-freies Medium

Die Lösungen A und B werden gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Vor Zugabe der fertigen Lipofektionslösung werden die Zellen einmal mit Serum-freiem Medium gewaschen.

Das Medium wird vollständig entfernt und die 300 μ l Lipofektionslösung auf die 24-Loch-Platte gegeben. Danach werden die Zellen für 5 Stunden bei 5 % CO₂ und 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit wird die Lipofektionslösung entnommen und durch Zellkulturmedium ersetzt.

Die Auswertung der Transfektion erfolgt am nächsten Tag durch einen In-situ-Lac-Z-Assay:

Das transfizierte Plasmid pCMVLacZ kodiert für die β -Galactosidase, die aus der zunächst farblosen Lösung ein blaues, unlösliches Reaktionsprodukt in den Zellen erzeugt. Die Zellen wer-

den dabei zunächst fixiert und dann mit der Färbelösung inkubiert. Die Transfektionseffizienz ergibt sich aus der Anzahl der gefärbten Zellen/Gesamtzellzahl und wird im Mikroskop bestimmt.

Erste Ergebnisse aus dem Labor der Erfinder zeigen, daß durch die Partikel gemäß Beispiel 2, 3 und 5 sowie die Peptide gemäß Beispiel 4 eine Transfektion vermittelt werden kann, deren Effizienz oberhalb der Effizienz von Adenovirus-vermittelter Lipofektion liegt.

Patentansprüche

1. Vom Coxsackievirus, vorzugsweise vom CVB, weiter vorzugsweise vom CVB3 abgeleitete, nicht infektiöse Partikel oder Peptide, die dazu geeignet sind, im Rahmen einer Transfektion von Zellen endosomolytisch zu wirken.
2. Vom Coxsackievirus, vorzugsweise vom CVB, weiter vorzugsweise vom CVB3 abgeleitete, nicht infektiöse Partikel oder Peptide, die dazu geeignet sind, im Rahmen einer Transfektion von Zellen die Endocytose zu verstärken.
3. Partikel nach Anspruch 1 oder 2, ausgewählt aus der Gruppe:
 - a) leere CV-, vorzugsweise CVB-Kapsidpartikel,
 - b) durch Abspaltung von Virusprotein 4 (VP4) entstandene CV-, vorzugsweise CVB-A-Partikel,
 - c) CV-, vorzugsweise CVB-Proviruspartikel, bei denen die Virusproteine 2 (VP2) und 4 (VP4) noch fusioniert sind,
 - d) modifizierte Formen der Partikel aus a), b) oder c), und
 - e) durch genetische Modifikation replikationsinkompetente CV-, vorzugsweise CVB-, weiter vorzugsweise CVB3-Partikel.
4. Peptid nach Anspruch 1 oder 2, das vorzugsweise weniger als 30 Aminosäuren umfaßt und ausgewählt ist aus der Gruppe:

- a) Peptide mit den Aminosäuresequenzen SEQ ID Nr. 1, SEQ ID Nr. 2, SEQ ID Nr. 3, SEQ ID Nr. 4, SEQ ID Nr. 5, SEQ ID Nr. 6, SEQ ID Nr. 7, SEQ ID Nr. 8, SEQ ID Nr. 9, SEQ ID Nr. 10 aus dem Sequenzprotokoll,
 - b) Peptide, bei denen gegenüber den Peptiden aus a) eine oder mehrere der Aminosäuren fehlen oder gegen eine andere ausgetauscht sind, und
 - c) Peptide oder Polypeptide, die die Aminosäuresequenz eines der Peptide aus a) oder b) umfassen.
5. Verfahren zur Erzeugung eines Partikels nach Anspruch 3, mit den Schritten:
- Isolieren von nativen Cocksackievirus-Partikeln,
 - Erhitzen der isolierten Cocksackievirus-Partikel für 5 - 20 min, vorzugsweise ca. 10 min auf über 45°C, vorzugsweise ca. 51°C.
6. Verfahren zur Erzeugung eines Partikels nach Anspruch 3, mit den Schritten:
- Bereitstellen einer Matrix von gekoppeltem Cocksackievirus-Rezeptor,
 - Beschicken der Matrix mit nativen Cocksackievirus-Partikeln, und
 - Eluieren der Matrix.
7. Verfahren zur Transfektion von Zellen, vorzugsweise von kardialen Myozyten mit einem Polyanion, vorzugsweise einer therapeutischen Gensequenz, bei dem zur Verstärkung der Transfektion zumindest ein Partikel oder Peptid nach einem der Ansprüche 1 bis 4 eingesetzt wird.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß vor der Transfektion ein Komplex aus dem Polyanion, dem Peptid sowie einem kationischen Lipid, vorzugsweise DOTMA gebildet wird.
9. Verfahren zur Formulierung von Komplexen für den Transfer eines Polyanions, vorzugsweise einer therapeutischen Gensequenz in Zellen, vorzugsweise kardiale Myozyten, bei dem das Polyanion mit zumindest einem Partikel oder Peptid nach einem der Ansprüche 1 bis 4 inkubiert wird.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid vor der Inkubation mit dem Polyanion mit einem kationischen Lipid, vorzugsweise mit DOTMA, vorinkubiert wird.
11. Verwendung eines Partikels oder Peptides nach einem der Ansprüche 1 bis 4, für die Therapie, Diagnostik oder Prophylaxe von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, insbesondere von Kardiomyopathien.
12. Verwendung eines Partikels oder Peptides nach einem der Ansprüche 1 bis 4 als Agens zur Verbesserung der Transfektion von Zellen, vorzugsweise kardialen Myozyten, insbesondere zur Verbesserung der Lipofektion bei der Gentherapie.
13. Replizierbarer Expressionsvektor, der eine Gensequenz enthält, die auf exprimierbare Weise für ein Peptid oder Partikel nach einem der Ansprüche 1 bis 4 kodiert.

14. DNA-Isolat mit einer DNA-Sequenz, die für ein Partikel oder Peptid nach einem der Ansprüche 1 bis 4 kodiert.
15. Kit für die Formulierung von transfizierbaren Komplexen, insbesondere für die Gentherapie, der zumindest ein Partikel oder Peptid nach einem der Ansprüche 1 bis 4 enthält.
16. Therapeutische Zusammensetzung mit zumindest einem Partikel oder Peptid nach einem der Ansprüche 1 bis 4.
17. Vektor-Plasmid mit zumindest einer DNA-Sequenz, die für ein genetisch modifiziertes CV-, vorzugsweise CVB-, weiter vorzugsweise CVB3-Genom kodiert, bei dem Anteile der kodierenden Sequenz ausgetauscht oder verändert sind, so daß das Virusgenom nicht infektiös ist, und mit einem der DNA-Sequenz vorgeschalteten Promotor.
18. Helfer-Konstrukt zum Komplementieren der bei dem Vektor-Plasmid aus Anspruch 17 veränderten oder ausgetauschten Anteile der kodierenden Sequenz des Virusgenoms.
19. Helfer-Konstrukt nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Helfer-Plasmid ist, das für zumindest einen der ausgetauschten oder veränderten Anteile in translatierbarer Weise kodiert.

20. Helfer-Konstrukt nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß es ein viraler Vektor ist, der für zumindest einen der ausgetauschten oder veränderten Anteile in translatierbarer Weise kodiert.
21. Helfer-Konstrukt nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Helferzelle ist, die stabil mit für mindestens einen der ausgetauschten oder veränderten Anteile kodierender Helfer-DNA transfiziert ist.
22. Verfahren zur Erzeugung des durch genetische Modifikation replikationsinkompetenten Partikels aus Anspruch 3 e), mit den Schritten:
 - Transfizieren von Wirtszellen mit dem Vektor-Plasmid nach Anspruch 17, und
 - Komplementieren der ausgetauschten oder veränderten Anteile in der Wirtszelle durch das Helfer-Konstrukt nach einem der Ansprüche 18 bis 20.
23. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Wirtszelle die Helferzelle nach Anspruch 21 ist.

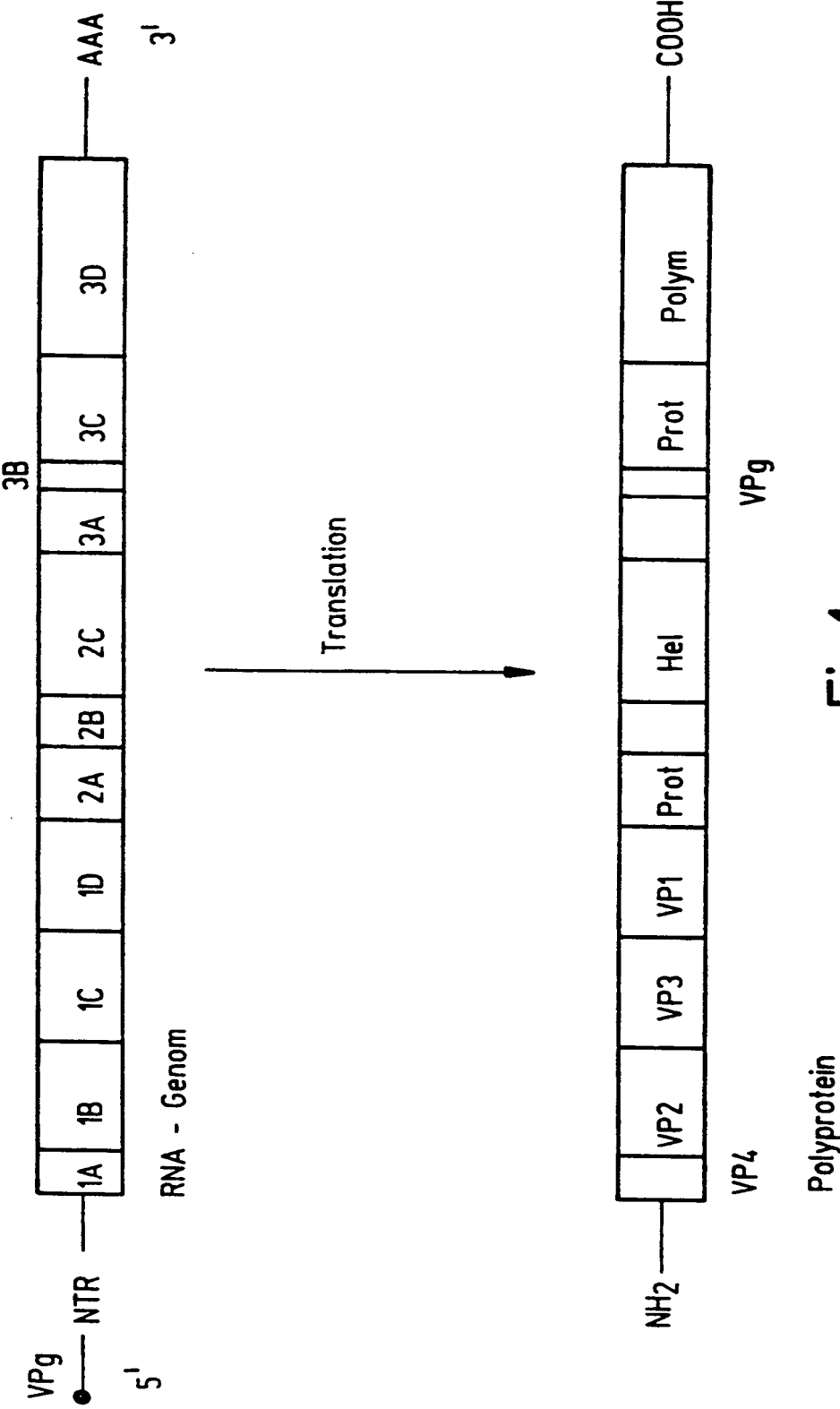


Fig.1

2 / 2

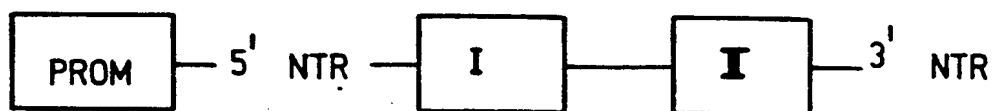


Fig.2



Fig.3

¹ SEQUENZPROTOKOLL

<110> Eberhard-Karls-Universitaet Tuebingen

<120> Verwendung des Cocksackievirus zur Verbesserung der
Transfektion von Zellen

<130> 5402P171

<140>

<141>

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> Cocksackievirus B

<400> 1

Arg	Val	Val	Tyr	Asn	Ala	Gly	Met	Gly	Val	Gly	Asn	Leu	Thr	Ile	Phe
1				5					10					15	

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Cocksackievirus B

<400> 2

Leu	Pro	Thr	Met	Asn	Thr	Pro	Gly	Ser	Cys	Gln	Phe	Leu	Thr	Ser	Asp
1				5					10					15	

Asp

2

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> Cocksackievirus B

<400> 3

Lys Leu Thr Phe Met Phe Cys Gly Ser Ala Met Ala Thr Gly

1

5

10

<210> 4

<211> 14

<212> PRT

<213> Cocksackievirus B

<400> 4

Leu Thr Phe Met Phe Cys Gly Ser Ala Met Ala Thr Gly Lys

1

5

10

<210> 5

<211> 14

<212> PRT

<213> Cocksackievirus B

<400> 5

Lys Phe Leu Leu Ala Tyr Ser Pro Pro Gly Ala Gly Ala Pro

1

5

10

<210> 6

<211> 18

<212> PRT

<213> Cocksackievirus B

<400> 6

Phe Leu Leu Ala Tyr Ser Pro Pro Gly Ala Gly Ala Pro Thr Lys Arg
1 5 10 15

Val Asp

<210> 7

<211> 20

<212> PRT

<213> Cocksackievirus B

<400> 7

Ile Leu Thr His Gln Ile Met Tyr Val Pro Pro Gly Gly Pro Val Pro
1 5 10 15

Asp Lys Val Asp

20

<210> 8

<211> 18

<212> PRT

<213> Cocksackievirus B

<400> 8

Asp Lys Val Asp Ser Tyr Val Trp Gln Thr Ser Thr Asn Pro Ser Val
1 5 10 15

Phe Trp

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> Cocksackievirus B

<400> 9

Val	Tyr	Gly	Ile	Asn	Thr	Leu	Asn	Asn	Met	Gly	Thr	Leu	Tyr	Ala	Arg
1				5					10					15	

His

<210> 10

<211> 18

<212> PRT

<213> Cocksackievirus B

<400> 10

Tyr	Gly	Val	Trp	Arg	Asp	Tyr	Leu	Lys	Asp	Ser	Glu	Ala	Thr	Ala	Glu
1				5					10					15	

Asp Gln

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No.

PCT/EP 00/03588

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/86 C12N15/87 C12N15/88 C12N7/01 C12N7/04
C07K14/085 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KERN C. ET AL.: "Coxsackievirus-verstärkter endosomolytischer Gentransfer in kontraktile Kardiomyozyten." VERH. DTSCH. GES. PATH., vol. 81, 1997, page 611 XP000929840 cited in the application abstract	1-3, 7-12, 15
Y	—	5, 6
Y	MCGEADY M. L. AND CROWELL R. L.: "Proteolytic cleavage of VP1 in 'A' particles of Coxsackievirus B3 does not appear to mediate virus uncoating by HeLa cells." J. GEN. VIROL., vol. 55, 1981, pages 439-450, XP000929909 the whole document	5, 6
	— -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 August 2000

Date of mailing of the international search report

24/08/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mandl, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. don. Application No.

PCT/EP 00/03588

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>RAAB DE VERDUGO U. ET AL.: "Characterization of a 100-kilodalton binding protein for the six serotype of Coxsackie B viruses." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 69, no. 11, November 1995 (1995-11), pages 6751-6757, XP002074335 page 6753, left-hand column, last paragraph -right-hand column, paragraph 1 page 6755, left-hand column, last paragraph -right-hand column, paragraph 1</p>	6
X	<p>YANG Y.-Z. ET AL.: "Study on the etiological diagnosis and immunization of viral myocarditis: producing non-infectious CVB3 particles by recombinant vaccinia virus." JOURNAL OF MOLECULAR AND CELLULAR CARDIOLOGY, vol. 30, June 1998 (1998-06), page A185 XP000929896 the whole document</p>	1-3,11, 13,14, 16-18,22
X	<p>PLANK C. ET AL.: "Application of membrane-active peptides for drug and gene delivery across cellular membranes." ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, vol. 34, 1998, pages 21-35, XP000929877 the whole document</p>	1,2, 7-12,15, 16
X	<p>LINDBERG A. M. ET AL.: "Genome of Coxsackievirus B3" VIROLOGY, vol. 156, 1987, pages 50-63, XP000929890 cited in the application the whole document</p>	3
A	<p>ZAUNER W. ET AL.: "Rhinovirus-mediated endosomal release of transfection complexes." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 69, no. 2, 1995, pages 1085-1092, XP002144697 ISSN: 0022-538X the whole document</p>	1-23
	-/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 00/03588

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>COTTEN M. ET AL.: "HIGH-EFFICIENCY RECEPTOR-MEDIATED DELIVERY OF SMALL AND LARGE 48 KILOBASE GENE CONSTRUCTS USING THE ENDOSOME-DISRUPTION ACTIVITY OF DEFECTIVE OR CHEMICALLY INACTIVATED ADENOVIRUS PARTICLES"</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 89, no. 13, 1992, pages 6094-6098, XP002144698</p> <p>1992</p> <p>ISSN: 0027-8424</p> <p>the whole document</p>	1-23
A	<p>WAGNER E. ET AL.: "INFLUENZA VIRUS HEMAGGLUTININ HA-2 N-TERMINAL FUSOGENIC PEPTIDES AUGMENT GENE TRANSFER BY TRANSFERRIN-POLYLYSINE-DNA COMPLEXES: TOWARD A SYNTHETIC VIRUS-LIKE GENE-TRANSFER VEHICLE"</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, US, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, vol. 89, no. 17, 1 September 1992 (1992-09-01), pages 7934-7938, XP000371760</p> <p>ISSN: 0027-8424</p> <p>The whole document, in particular page 7934, left column, second last paragraph.</p>	1-23
A	<p>US 5 547 932 A (CURIEL DAVID T ET AL)</p> <p>20 August 1996 (1996-08-20)</p> <p>column 13, last paragraph</p> <p>column 14, paragraph 4 - last paragraph</p> <p>column 17, paragraph 5 - paragraph 6</p> <p>example 29</p>	1-23
A	<p>WO 98 39426 A (KOLBECK PETER ; UNIV NEBRASKA (US); CHAPMAN NORA M (US); MALONE JAM) 11 September 1998 (1998-09-11)</p> <p>the whole document</p>	17-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. No. Application No

PCT/EP 00/03588

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5547932 A	20-08-1996	US 6022735 A	08-02-2000
		US 6077663 A	20-06-2000
		US 5981273 A	09-11-1999
		AU 671084 B	15-08-1996
		AU 2652692 A	03-05-1993
		BG 98718 A	28-02-1995
		BR 9206559 A	08-11-1994
		CA 2118816 A	31-03-1993
		CZ 9400746 A	17-05-1995
		WO 9307283 A	15-04-1993
		EP 0545016 A	09-06-1993
		EP 0607206 A	27-07-1994
		FI 941474 A	30-03-1994
		HU 71312 A	28-11-1995
		HU 9500694 A	29-01-1996
		JP 10506001 T	16-06-1998
		MX 9205543 A	01-05-1993
		NO 941154 A	29-03-1994
		NZ 244306 A	26-07-1995
		SG 44680 A	19-12-1997
		SI 9200236 A	31-03-1993
		SK 36894 A	10-08-1994
		CN 1070946 A	14-04-1993
		RU 2138553 C	27-09-1999
		ZA 9207460 A	21-02-1994
WO 9839426 A	11-09-1998	US 6071742 A	06-06-2000
		AU 6346098 A	22-09-1998
		EP 0973879 A	26-01-2000

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Int. No. Aktenzeichen

PCT/EP 00/03588

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/86 C12N15/87 C12N15/88 C12N7/01 C12N7/04
C07K14/085 A61K48/00

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	KERN C. ET AL.: "Coxsackievirus-verstärkter endosomolytischer Gentransfer in kontraktile Kardiomyozyten." VERH. DTSCH. GES. PATH., Bd. 81, 1997, Seite 611 XP000929840 in der Anmeldung erwähnt	1-3, 7-12,15
Y	Zusammenfassung	5,6
Y	MCGEADY M. L. AND CROWELL R. L.: "Proteolytic cleavage of VP1 in 'A' particles of Coxsackievirus B3 does not appear to mediate virus uncoating by HeLa cells." J. GEN. VIROL., Bd. 55, 1981, Seiten 439-450, XP000929909 das ganze Dokument	5,6
	—/—	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

10. August 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

24/08/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Mandl, B

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>RAAB DE VERDUGO U. ET AL.: "Characterization of a 100-kilodalton binding protein for the six serotype of Coxsackie B viruses." JOURNAL OF VIROLOGY, Bd. 69, Nr. 11, November 1995 (1995-11), Seiten 6751-6757, XP002074335 Seite 6753, linke Spalte, letzter Absatz -rechte Spalte, Absatz 1 Seite 6755, linke Spalte, letzter Absatz -rechte Spalte, Absatz 1</p>	6
X	<p>YANG Y.-Z. ET AL.: "Study on the etiological diagnosis and immunization of viral myocarditis: producing non-infectious CVB3 particles by recombinant vaccinia virus." JOURNAL OF MOLECULAR AND CELLULAR CARDIOLOGY, Bd. 30, Juni 1998 (1998-06), Seite A185 XP000929896 das ganze Dokument</p>	1-3,11, 13,14, 16-18,22
X	<p>PLANK C. ET AL.: "Application of membrane-active peptides for drug and gene delivery across cellular membranes." ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, Bd. 34, 1998, Seiten 21-35, XP000929877 das ganze Dokument</p>	1,2, 7-12,15, 16
X	<p>LINDBERG A. M. ET AL.: "Genome of Coxsackievirus B3" VIROLOGY, Bd. 156, 1987, Seiten 50-63, XP000929890 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p>	3
A	<p>ZAUNER W. ET AL.: "Rhinovirus-mediated endosomal release of transfection complexes." JOURNAL OF VIROLOGY, Bd. 69, Nr. 2, 1995, Seiten 1085-1092, XP002144697 ISSN: 0022-538X das ganze Dokument</p>	1-23
	-/-	

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>COTTEN M. ET AL.: "HIGH-EFFICIENCY RECEPTOR-MEDIATED DELIVERY OF SMALL AND LARGE 48 KILOBASE GENE CONSTRUCTS USING THE ENDOSOME-DISRUPTION ACTIVITY OF DEFECTIVE OR CHEMICALLY INACTIVATED ADENOVIRUS PARTICLES"</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, Bd. 89, Nr. 13, 1992, Seiten 6094-6098, XP002144698</p> <p>1992</p> <p>ISSN: 0027-8424</p> <p>das ganze Dokument</p>	1-23
A	<p>WAGNER E. ET AL.: "INFLUENZA VIRUS HEMAGGLUTININ HA-2 N-TERMINAL FUSOGENIC PEPTIDES AUGMENT GENE TRANSFER BY TRANSFERRIN-POLYLYSINE-DNA COMPLEXES: TOWARD A SYNTHETIC VIRUS-LIKE GENE-TRANSFER VEHICLE"</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, US, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, Bd. 89, Nr. 17, 1. September 1992 (1992-09-01), Seiten 7934-7938, XP000371760</p> <p>ISSN: 0027-8424</p> <p>das ganze Dokument, insbesondere Seite 7934, linke Spalte, vorletzte Absatz</p>	1-23
A	<p>US 5 547 932 A (CURIEL DAVID T ET AL)</p> <p>20. August 1996 (1996-08-20)</p> <p>Spalte 13, letzter Absatz</p> <p>Spalte 14, Absatz 4 - letzter Absatz</p> <p>Spalte 17, Absatz 5 - Absatz 6</p> <p>Beispiel 29</p>	1-23
A	<p>WO 98 39426 A (KOLBECK PETER ; UNIV NEBRASKA (US); CHAPMAN NORA M (US); MALONE JAM) 11. September 1998 (1998-09-11)</p> <p>das ganze Dokument</p>	17-23

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationale Aktenzeichen

PCT/EP 00/03588

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(r) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5547932 A	20-08-1996	US 6022735 A	08-02-2000
		US 6077663 A	20-06-2000
		US 5981273 A	09-11-1999
		AU 671084 B	15-08-1996
		AU 2652692 A	03-05-1993
		BG 98718 A	28-02-1995
		BR 9206559 A	08-11-1994
		CA 2118816 A	31-03-1993
		CZ 9400746 A	17-05-1995
		WO 9307283 A	15-04-1993
		EP 0545016 A	09-06-1993
		EP 0607206 A	27-07-1994
		FI 941474 A	30-03-1994
		HU 71312 A	28-11-1995
		HU 9500694 A	29-01-1996
		JP 10506001 T	16-06-1998
		MX 9205543 A	01-05-1993
		NO 941154 A	29-03-1994
		NZ 244306 A	26-07-1995
		SG 44680 A	19-12-1997
		SI 9200236 A	31-03-1993
		SK 36894 A	10-08-1994
		CN 1070946 A	14-04-1993
		RU 2138553 C	27-09-1999
		ZA 9207460 A	21-02-1994
WO 9839426 A	11-09-1998	US 6071742 A	06-06-2000
		AU 6346098 A	22-09-1998
		EP 0973879 A	26-01-2000